



500.43725X00

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant(s): TAKENAKA, *et al.*

Serial No.: 10/814,232

Filed: April 1, 2004

Title: NUCLEIC-ACID AMPLIFYING APPARATUS AND NUCLEIC-ACID
AMPLIFYING METHOD

LETTER CLAIMING RIGHT OF PRIORITY

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

April 26, 2004

Sir:

Under the provisions of 35 USC 119 and 37 CFR 1.55, the applicant(s) hereby
claim(s) the right of priority based on:

Japanese Patent Application No. 2003-098744
Filed: April 2, 2003

A certified copy of said Japanese Patent Application is attached.

Respectfully submitted,

ANTONELLI, TERRY, STOUT & KRAUS, LLP

Melvin Kraus
Registration No.: 22,466

MK/rr
Attachment

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 4 月 2 日
Date of Application:

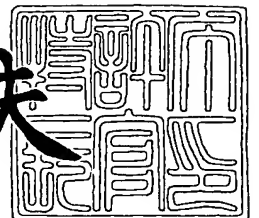
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 9 8 7 4 4
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 0 9 8 7 4 4]

出 願 人 株式会社日立製作所
Applicant(s):

2 0 0 4 年 4 月 1 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 3 1 3 1 1

【書類名】 特許願

【整理番号】 1503002341

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県土浦市神立町 5 0 2 番地 株式会社 日立製作所
機械研究所内

【氏名】 竹中 啓

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県土浦市神立町 5 0 2 番地 株式会社 日立製作所
機械研究所内

【氏名】 長岡 嘉浩

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県土浦市神立町 5 0 2 番地 株式会社 日立製作所
機械研究所内

【氏名】 渡部 成夫

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地 株式会社 日
立ハイテクノロジーズ 設計・製造統括本部 那珂事業
所内

【氏名】 福蘭 真一

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地 株式会社 日
立ハイテクノロジーズ 設計・製造統括本部 那珂事業
所内

【氏名】 横林 敏昭

【特許出願人】

【識別番号】 000005108

【氏名又は名称】 株式会社 日立製作所

【代理人】**【識別番号】** 100075096**【弁理士】****【氏名又は名称】** 作田 康夫**【電話番号】** 03-3212-1111**【手数料の表示】****【予納台帳番号】** 013088**【納付金額】** 21,000円**【提出物件の目録】****【物件名】** 明細書 1**【物件名】** 図面 1**【物件名】** 要約書 1**【プルーフの要否】** 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 核酸増幅装置及び核酸増幅方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核酸を含む試料と試薬とを含む反応流体の流れる流路と、
前記流路が複数の分岐流路に分岐される流路分岐部、分岐した前記複数の分岐流路が合流する合流部、合流した前記反応流体が導かれる合流流路と、を備え、
前記分岐流路に複数の設定温度域を備えた加熱機構を有する核酸増幅装置。

【請求項 2】

請求項 1 において、前記加熱機構は、第一の温度の第一加熱機構と第一の温度より低い第二の温度の第二加熱機構を備え、前記分岐流路は前記第一加熱機構で加熱された領域を通過した後前記第二加熱機構で加熱された領域を通過することを繰返すよう配置されている核酸増幅装置。

【請求項 3】

核酸を含む試料と試薬とを含む反応流体の流れる流路と、
前記流路を分岐する第一の分岐部と、
前記第一の分岐部から分岐した第一の分岐流路と、
前記第一分岐流路が合流する第一合流部と、
前記第一の合流部で合流した流路を再び分岐する第二の分岐部と、
前記第二の分岐部から分岐した第二の分岐流路と、
前記第二の分岐流路が合流する第二合流部と、を備え、
前記、第一の分岐流路と第二分岐流路に複数の設定温度域を備えた加熱機構を有する核酸増幅装置。

【請求項 4】

請求項 3 において、前記第一の分岐流路より前記第二の分岐流路の方が長く形成される核酸増幅装置。

【請求項 5】

請求項 3 において、前記第一の分岐流路及び第二の分岐流路を流れる前記反応流体は前記加熱機構により前記複数の設定温度に繰返し保持され、前記第一の分岐

流路を流下中の前記反応流体の前記加熱機構による温度変化繰返し回数より、前記第二の分岐流路を流下中の前記反応流体の前記加熱機構による温度変化繰返し回数の方が多くなるよう形成される核酸増幅装置。

【請求項 6】 請求項 3 において、前記第一の分岐流路と第二の分岐流路との間に試薬を供給する流路を有する核酸増幅装置。

【請求項 7】

請求項 1 において、前記合流部に連絡する第一の分岐流路と第二の分岐流路を有し、前記第一の分岐流路に第一の加熱温度とする第一の加熱機構と、第二分岐流路に第二の加熱温度とする第二の加熱機構を備える核酸増幅装置。

【請求項 8】

核酸を含む試料と前記試料に混合する試薬とを含む反応流体の流れる流路と、前記流路が複数の分岐流路に分岐される流路分岐部、分岐した前記複数の分岐流路が合流する合流部、合流した反応流体が導かれる合流流路と、前記合流流路に導かれた前記反応流体の核酸を検出する検出部と、を有し、前記分岐流路に複数の設定温度域を備えた加熱機構を有し、前記加熱機構は前記分岐流路が前記複数の温度域を繰返通過するよう形成される化学分析装置。

【請求項 9】

核酸を含む試料と前記試料に混合する試薬とを含む反応流体を分岐する分岐工程と、前記分岐された反応流体に複数の設定温度間での加熱冷却を繰り返す繰返加熱冷却工程と、前記繰返し加熱冷却された複数の前記分岐された反応流体を合流する合流工程と、を有する核酸増幅方法。

【請求項 10】

核酸を含む試料と前記試料に混合する試薬とを含む反応流体を分岐する第一の分岐工程と、前記分岐された反応流体に複数の設定温度間での加熱冷却を繰り返す第一の繰返加熱冷却工程と、

前記繰返し加熱冷却された複数に分岐された反応流体を合流する第一の合流工程と、

前記合流された反応流体を再度分岐する第二の分岐工程と、

第二の分岐工程で分岐された反応流体に複数の設定温度間での加熱冷却を繰り返す第二の繰返し加熱冷却工程と、

前記第二の繰返し加熱冷却工程を経た複数に分岐された反応流体を合流する第二の合流工程と、を有する核酸増幅方法。

【請求項 1 1】

請求項 1 0 において、前記第一の繰返し加熱工程における繰返し加熱回数より前記第二の繰返し加熱工程における繰返し加熱回数の方が多くなるよう形成された核酸増幅方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、検体中の核酸を増幅する機構を備えた核酸増幅装置に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】 微量の核酸を増幅する方法として、一般的に良く知られている方法として、PCR法がある。この方法は、2 本鎖のDNAを鋳型とし、特定領域を挟むように短いプライマーDNAを各相補鎖にハイブリッド結合させ、基質である4 種類のデオキシヌクレオチド三リン酸の存在下、DNAポリメラーゼを作用させると、このプライマーの3' 末端に、鋳型の塩基配列に従ってヌクレオチドが添加され、鎖が伸長する。PCR法の原理は、この反応でできた新たな2 本鎖DNAを加熱して相補鎖に分離し、過剰に存在するプライマーを再び該当位置にハイブリッド結合させ、DNAポリメラーゼ反応で新たなDNA鎖を合成させることである。この反応が繰り返されることで、目的領域を含むDNA断片を大量に増やすことが可能になる。

【0 0 0 3】

PCR法を自動的に行う装置としては、サンプルを入れるホルダーを直接加熱・冷却することで温度調節を行うヒートブロック方式のサーマルサイクラーが一

般的である。

【 0 0 0 4 】

一方、複数の温度域を通過する流路に P C R 反応混合物を流動させることで、P C R 反応混合物に P C R 増幅反応に必要な温度変化を与え、核酸を増幅する方法（以下フロースルー増幅法）とそれを実現する装置が報告されている。

【 0 0 0 5 】

フロースルー増幅法とそれを実現する装置として、特開平 6 - 3 0 7 7 6 に、DNA 増幅方法及び DNA 増幅装置が示されている。この方法は、外部に加熱部を設けた一本のキャピラリー（内径 0.5mm、外形 1.5mm、長さ 10m 以上）の中に PCR 反応混合物を流動させることで、PCR 反応混合物に必要な温度変化を与え、PCR 反応を行う。

【 0 0 0 6 】

また、1998 年のサイエンス誌の 282 巻 484 頁から 487 頁に、ナノリッター DNA 分析装置が示されている。この装置は、マイクロファブリケーション技術により製作されたマイクロ流路（加熱部の流路（幅 500 μ m、深さ 50 μ m、長さ 1cm 以上）、ヒーター、温度センサー、蛍光検出器を備え、PCR 反応混合物が異なる温度域を通過する一本のマイクロ流路を流れることで、PCR 反応混合物を加熱・冷却し、PCR 反応による核酸増幅を行い、増幅した核酸を蛍光検出する。

【特許文献 1】

特開平 6 - 3 0 7 7 6 号公報

【非特許文献 1】

1998 年サイエンス誌、282 巻、484 頁から 487 頁

【 0 0 0 7 】

【発明が解決しようとする課題】

ヒートブロック式のサーマルサイクラーは、ブロックを目的温度に加熱、冷却するための時間が存在するため、増幅反応終了まで必要とする時間が長くなる。また、増幅反応が終了するまでの時間が長くなることは、酵素の失活につながり、増幅量の減少の原因の一つとなっている。

【 0 0 0 8 】

一方、フロースルー増幅法はPCR反応混合物が加熱部を通過する間に、反応混合物の温度を目的の温度に変化する必要がある。PCR反応混合物の量あたりの表面積を増やすため、PCR反応混合物が通過する流路は、断面積に対して長さが必要になる。そのため一本の流路にPCR反応混合物を流動させる場合、使用できるPCR反応混合物の量は小さくなる。ヒートブロック式のサーマルサイクラーで使用するPCR反応混合物の量は一般的に $10\mu\text{l}$ ～ $100\mu\text{l}$ であるのに対して、特開平6-30776号公報に示されるDNA増幅装置で使用しているPCR反応混合物は $5\mu\text{l}$ 、1998年のサイエンス誌の282巻484頁から487頁のナノリッターDNA分析装置で使用しているPCR反応混合物は120nlである。しかし、PCR反応混合物の量を増やすと、PCR反応混合物は流路の長さ方向に長く広がる。そのため、反応混合物が複数の温度領域にまたがって流動するため、反応混合物の温度分布が不均一になり、増幅反応がうまく行われない。

【0009】

また、直径の大きい流路を用いた場合は、PCR反応混合物あたりの表面積が減少し、熱効率が減少するので増幅反応に必要な時間が長くなる。

【0010】

さらに、前記従来技術では、一本の流路が複数の温度域を通過しているため、適したPCRサイクルが不明の鋳型核酸を増幅するには、PCRの温度サイクルをあらかじめ調べておく必要がある。

【0011】

そこで、本発明の目的は、上記従来技術の課題の少なくとも一つを解決する酸増幅装置を提供することにある。

【0012】

【課題を解決するための手段】

(1) 上記課題を解決するために、本発明は、目的の核酸を増幅する試薬を複数の温度域を通過する流路が分岐している構造を持つ核酸増幅装置を有する。

【0013】

例えば、核酸を含む試料と前記試料に混合する試薬とを含む反応流体の流れる流路と、前記流路が複数の分岐流路に分岐される流路分岐部、分岐した前記複数

の分岐流路が合流する合流部、合流した反応液が導かれる合流流路と、を備え、前記分岐流路に複数の設定温度域を備えた加熱機構を有する核酸増幅装置である。

【0014】

これにより、高速で温度変化させることができ、表面積を増大させて受熱量を増大できるので、なだらかな温度分布となることを抑制して、短時間で増幅の温度繰返ができるので、増幅効率を向上させることができる。

(2) より好ましくは、反応流体の流れる流路は分岐したのち合流する構造を複数回繰り返すことを特徴とする。

【0015】

例えば、核酸を含む試料と試薬とを含む反応流体の流れる流路と、前記流路の前記反応流体を分岐する第一の分岐部と、前記第一の分岐部から分岐した複数の第一の分岐流路と、前記複数の第一分岐流路が合流する第一合流部と、前記第一の合流部の下流側に前記合流した前記反応流体を分岐する第二の分岐部と、前記第二の分岐部から分岐した複数の第二の分岐流路と、前記複数の第二の分岐流路が合流する第二合流部と、を備え、前記、第一の分岐流路と第二分岐流路に複数の設定温度域を備えた加熱機構を有する核酸増幅装置である。

【0016】

なお、例えば、前記試薬は酵素を含む増幅液であり、前記合流流路に連絡する核酸を検出する検出部を有する。

【0017】

これにより、低濃度の核酸を含む反応流体が供給された場合、分岐流路のレーンごとの核酸量のばらつきが増幅量のばらつきになる。しかし、いったん合流して再度分岐加熱することにより、レーンごとのバラツキ量の緩和でき、増幅効率の増加させることができる。

【0018】

また、例えば、前記第一の分岐流路より前記第二の分岐流路の方が長く形成される。これにより、第一の分岐流路内に核酸のばらつきがあってもある程度増幅して、一旦合流後分岐して再度第二の分岐流路で分岐して十分増幅すると、ばら

つきを効果的に緩和でき、十分な増幅を行うことができるので増幅効果が増大できる

(3) また、分析装置としては、核酸を含む試料と前記試料に混合する試薬とを含む反応流体の流れる流路と、前記流路が複数の分岐流路に分岐される流路分岐部、分岐した前記複数の分岐流路が合流する合流部、合流した反応液が導かれる合流流路と、前記合流流路に導かれた前記反応流体の核酸を検出する検出部と、を有し、前記分岐流路に複数の設定温度域を備えた加熱機構を有し、前記加熱機構は前記分岐流路が複数の温度域を繰返通過するよう配置されることを特徴とする。

(4) 核酸増幅方法としては、核酸を含む試料と前記試料に混合する試薬とを含む反応流体を分岐する分岐工程と、前記分岐された反応流体に複数の設定温度間での加熱冷却を繰り返す繰返加熱工程と、前記繰返し加熱冷却された複数の分岐された反応流体を合流する合流工程と、を有する。

【0019】

又は、核酸を含む試料と前記試料に混合する試薬とを含む反応流体を分岐する第一の分岐工程と、前記分岐された反応流体に複数の設定温度間での加熱冷却を繰り返す第一の繰返加熱工程と、前記繰返し加熱冷却された複数の分岐された反応流体を合流する第一の合流工程と、前記合流された反応流体を再度分岐する第二の分岐工程と、第二の分岐工程で分岐された反応流体に複数の設定温度間での加熱冷却を繰り返す第二の繰返加熱工程と、前記第二の繰返し加熱冷却工程を経た複数の分岐された反応流体を合流する第二の合流工程と、を有する。

【0020】

また、上記流路を試薬が流動しているときの核酸の増幅の様子を調べるための検出機構を備え、検出後の流路が通過する複数の温度域の温度を設定することができることが好ましい。

【0021】

【発明の実施の形態】

図1～図29を参照して、本発明による遺伝子分析装置の実施例を説明する。
なお、本発明は、当該明細書に開示の形態に限定されるものではなく、周知技術

及び今後周知技術となる技術に基く変更を許容するものである。

(実施例 1)

適当な PCR のサイクルが不明の核酸を増幅するときの実施例を以下で示す。

図 1 は、本遺伝子分析装置 1 の全体構成図である。遺伝子分析装置 1 は、核酸増幅チップ 10 を備え付ける設置台 40 と、作業内容を入力するモニタ 41 と、作業内容を入力するためのパネル 42 と、増幅した核酸を検出するための光学機器（図示せず）を備える。パネル 42 により入力された作業内容に従い、遺伝子分析装置 1 は核酸増幅チップ 10 を介して遺伝子を増幅、検出する。光学装置により検出した遺伝子の量や種類はモニタ 41 に出力される。

【0022】

図 2 から図 7 を用いて、核酸増幅チップ 10 の構造を説明する。

図 2 は、核酸増幅チップ 10 の外観図である。核酸増幅チップ 10 は、使用する試薬を流動させるための溝を刻んだ流路部 20（図 3）と、流路部 20 の流路の温度を制御するための温度制御部 30（図 4）を接合して構成する。

流路部 20 は、試薬注入流路部 200、第一分岐流路部 203、第一増幅流路部 204、第一合流流路部 205、第二分岐流路部 206、第二増幅流路部 207、第二合流流路部 208、検出流路部 209 を構成する溝を温度制御部 30 との接触面側に持つ。

温度制御部 30 は流路部 20 の第一増幅流路部 204 を加温するための第一熱変性ヒーター 300 および、第一アニーリングヒーター 301 と、流路部 20 の第二増幅流路部 207 を加温するための第二熱変性ヒーター 302、第二アニーリングヒーター 303 を流路部 20 との接触面側に備え、それぞれのヒーターは温度センサー（図示せず）を備えている。ヒーターと温度センサーは電極端子 306 を介して図 1 の遺伝子増幅装置 1 とつながり、ヒーターの温度は遺伝子増幅装置 1 のパネル 42 により、自由に設定することができる。また、温度制御部 30 は反応液注入口 307、洗浄液注入口 308、廃液口 309 となる貫通孔も備える。

【0023】

このように、図 3 の形態は、目的の核酸を増幅する試薬を複数の温度域を通過

する流路が分岐している構造を持つ核酸増幅装置を構成する特徴を有する。具体的には、核酸を含む試料と前記試料に混合する試薬とを含む反応流体の流れる流路と、前記流路が複数の分岐流路に分岐される流路分岐部である第一分岐流路部 203、分岐した前記複数の分岐流路が合流する合流部である第一合流流路部 203、合流した反応液が導かれる合流流路と、を備え、前記分岐流路に複数の設定温度域を備えた加熱機構を有する点を特徴とする。

【0024】

これにより、高速温度変化を得ることができ、流路表面積を増大させて受熱量を増大できるので、効果的に昇温降下を繰り返して核酸の増幅をすることができる。

【0025】

また、上記の流路は分岐したのち合流する構造を複数回繰り返すことを特徴とする。

【0026】

低濃度の核酸を含む反応流体が供給された場合、分岐流路のレーンごとの核酸量のばらつきが増幅量のばらつきになる。単に増幅したのでは、全体としての増幅効率低下する。このため、いったん合流して再度分岐して増幅することにより、レーンごとのバラツキ量の緩和でき、増幅効率を増加させることができる。

【0027】

例えば、第一の増幅工程より第二の増幅工程の方を長くする点を特徴とする。

【0028】

具体的構造としては、前記第一の分岐流路より前記第二の分岐流路の方が長く形成される。或いは、例えば、第一の分岐流路及び第二の分岐流路を流れる反応液は加熱機構であるヒータにより前記複数の設定温度に繰返し保持され、第一の分岐流路を流下中の前記反応液の温度変化繰返し回数より、前記第二の分岐流路を流下中の前記反応液の温度変化繰返し回数の方が多くなるよう形成される。

【0029】

これにより、初めの増幅工程において増幅ばらつきがあっても、ある程度増幅して合流後に分岐して各々の分岐流路で再度十分増幅すると、ばらつきをより緩

和でき、十分な増幅を行うことができるので増幅効果が増大できる。

【0030】

図5は、流路部20の第二分岐部206、第二増幅流路部207、第二合流部208における、流路部20と温度制御部30の対応図である。第二増幅流路部207を構成する流路は、温度制御部30の第二熱変性ヒーター302上および、第二アニーリングヒーター303上を交互に通過する。同様に、第一増幅流路部204を構成する流路も第一熱変性ヒーター300上と第一アニーリングヒーター301上を交互に通過する。図5の範囲Aの拡大図を図6に示す。図7は、図6の断面線Bにおける核酸増幅チップ10の組図の断面図である。温度制御部30の流路部20と接する面は、絶縁膜305で覆われている。核酸増幅チップ10の流路は、流路部20上の溝と温度制御部の表面が接合することで構成されている。

【0031】

このように、加熱機構は、第一の温度の第一加熱機構であるヒータ300と第一の温度より低い第二の温度の第二加熱機構であるヒータ301を備え、前記第一加熱機構と前記加熱機構とで加熱された領域を通過するよう前記分岐流路が形成されている点が特徴である。そして、分岐流路は前記第一加熱機構で加熱された領域を通過した後前記加熱機構とで加熱された領域を通過することを複数回繰り返すよう配置されている。

【0032】

以下、核酸増幅チップ10内の流路を試薬が流動することで、目的の遺伝子を増幅し、検出する実施例を、図8から図23を用いて示す。増幅および検出動作の流れを図8に示す。

【0033】

はじめに、核酸増幅チップ10の温度制御部30の反応液注入口307から、鋳型となるDNAを含む反応液211を注入する(図9)。反応液は、DNA Polymerase、2種類のプライマー、dNTP、金属イオン、緩衝液、増幅したDNAを検出するための蛍光色素を含んでいる。蛍光色素は例えばCyber Green (Molecular Probe社)を使用する。反応液を注入した核酸増幅チップ10を遺伝子分析装置1の設

置台 40 に設置する。設置後、核酸増幅チップ 10 の温度制御部 30 のヒーターの温度を設定する。たとえば、第一熱変性ヒーター 300 は熱変性のため 95℃ に設定し、第一アニーリングヒーター 301 の設定温度はそれぞれ異なる設定にする。例えば、図 10 に示すように、第一増幅流路部 204 を構成する微小流路に対応する第一アニーリングヒーター 301 を、それぞれ第一アニーリング小ヒーター 3011、3012、3013、3014、3015、3016、3017、3018 とし、温度を 55℃ から 62℃ まで 1℃ 刻みに設定する。

【0034】

設置後の核酸増幅チップ 10 と設置台 40 の関係を図 11 に示す。核酸増幅チップの電極端子 306 を設置台 40 の設置台電極端子 50 に取り付け、反応液注入口 307 に反応液注入口バルブ 46 を、洗浄液注入口 308 に洗浄液注入用バルブ 47 を、廃液口 309 に廃液口バルブ 48 を取り付ける。また、タンク 43 に洗浄液 49 を入れる。反応液や洗浄液の流動はポンプ 43 による圧力と各バルブ 46、47、48 の開閉により制御され、核酸増幅チップ 10 の流路を通過し、目的遺伝子を増幅・検出した後、廃液口 202 を通過し、廃液容器 51 に廃棄される。洗浄液には TE バッファーなどを用いる。

【0035】

反応液を遺伝子増幅チップ 10 に注入し、設置台 40 に設置した後、反応液 211 が第一分岐部 203 まで流動するまでの反応液 211 の流動の様子を図 12、図 13 に示す。廃液口バルブ 48 を開け、洗浄液注入バルブ 47 を閉じた状態で、ポンプ 43 を用いて反応液 211 を反応液合流部 210 まで押し出す（図 12）。次に、廃液口バルブ 48 を閉じ、洗浄液注入バルブ 47 を開け、ポンプ 43 を用いて、洗浄液 212 を反応液合流部 210 の手前まで押し出す。次に廃液口バルブを開け、反応液注入バルブ 46 を閉じ、ポンプ 43 を用いて、洗浄液 212 を押し出す。このとき反応液 211 と洗浄液 212 の間には空気の層 213 ができるため（図 13）、反応液 211 と洗浄液 212 は混合することはない。引き続き、ポンプ 43 により、反応液 211 は流路の下流方向に流動する。分岐した流路の断面積は同じであるため、反応液 211 は第一分岐部 203 を通過し、第一増幅流路部 204 に等量に分かれる。

【0036】

図14は、第一増幅流路204における温度制御部30との対応を示すものである。第一増幅流路部204の流路は、95℃に設定した第一熱変性ヒーター300上と55℃に設定した第一アニーリングヒーター301上を交互に通過する。等量に分かれた反応液211は、第一分岐部203を通過し、第一増幅流路部204に分離した後、第一増幅流路部204を流れることで、95℃の温度域と55℃の温度域を交互に通過する。図15から図18は、反応液211が第一増幅流路部204を通過し、DNAの増幅反応が起こる過程を図示したものである。反応液211が95℃に設定した第一熱変性ヒーター300上を通過するとき（図15）に熱変性による2本鎖DNAから1本鎖DNAへのかい離反応が起こり、次に55℃に設定した第一アニーリングヒーター301上を通過するとき（図16）に、1本鎖DNAは反応液211中のプライマーとアニーリング反応をする。さらに、反応液211が第一アニーリングヒーター301上から第一熱変性ヒーター上へ流動する過程（図17）において、DNA増幅反応が起こり、DNAは増幅する。反応液211は再び第一熱変性ヒーター上を通過（図18）し、2本鎖DNAは1本鎖DNAにかい離する。第一増幅流路部204を通過する過程で、反応液211には95℃—55℃の温度変化を繰り返すことによるPCR反応が起こり、DNAは増幅する。

【0037】

第一アニーリングヒーターの温度を設定温度がヒーターごとに異なるため、設定した温度の違いにより、分かれた反応液の増幅効率は異なる。第一増幅流路部204の最後215（図19）、まで、各反応液が流れてきたときに、光学機器（図示せず）により、微小流路2041、2042、2043、2044、2045、2046、2047、2048ごとの核酸の増幅量を検出する。検出結果より、もっとも増幅量の多い流路に用いたアニーリング温度を選択し、第二増幅流路207を加熱する第二アニーリングヒーター303の温度を決定する。例えば、アニーリング温度56℃が適当であるならば、第二アニーリングヒーター303を56℃に設定する。第二熱変性ヒーター302は核酸の熱変性のため95℃に設定する。

【0038】

第一増幅流路部 204 を通過した反応液 211 は、図 20 に示すように、第一増幅流路 204 を第一合流部 205 で合流し、分けた反応液 211 を混合する。混合することで、第一増幅流路部 204 における設定温度の違いにより生じた核酸の増幅量の違いを解消する。第一増幅流路部 204 においての増幅反応で、流路ごとの違いが大きくなりすぎないようにするため、第一増幅流路部 204 における 95℃—55℃ の温度変化の回数が 10 回程度になるように流路を設計する。

【0039】

また、図 21 に示すように、第一合流部 205 に対応する温度制御部 30 の箇所に混合用ヒーター 214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、を設け、ヒーター 214 とヒーター 215、ヒーター 216 とヒーター 217、ヒーター 218 とヒーター 219、ヒーター 220 とヒーター 221、ヒーター 222 とヒーター 223、ヒーター 224 とヒーター 225、ヒーター 226 とヒーター 227 を異なる温度に設定することで、第一合流部 205 の流路の合流部分に温度変化をつけ、熱拡散の違いを利用することで混合の効果をさらに強めてもよい。第一合流部 205 を通過した反応液 211 の成分の組成は、混合することで均一になる。

【0040】

このように、加熱機構の下流側で前記合流部の上流側の分岐流路に異なる設定温度の加熱機構を備えることを特徴とする。また、分岐したのち複数の温度域を通過し合流する構造をもつ流路を流動する試薬が、合流時に温度が異なるように合流部分に温度制御機能を持つことを特徴とする。

【0041】

具体的に例えば、合流部 205 に連絡する第一の分岐流路と第二の分岐流路を有し、前記第一の分岐流路に第一の加熱温度とする第一の加熱機構として第一のヒータと、第二分岐流路に第二の加熱温度とする第二の加熱機構として第二のヒータを備えることを特徴とする。

【0042】

引き続き、反応液 211 は図 22 に示す流路部 20 の第二分岐部 206 を通過し、第二増幅流路 207 へ、等量に分かれる。

【0043】

図 22 は、流路部 20 の第二分岐部 206、第二増幅流路 207、第二合流部 208 と、温度制御部 30 の第二熱変性ヒーター 302、第二アニーリングヒーター 303 との対応を示す。第二増幅流路 207 は、95℃ に設定した第二熱変性ヒーター 302 上と 55℃ に設定した第二アニーリングヒーター 303 上を交互に通過する。第一増幅流路部 204 の通過時と同様に、反応液中の核酸は第二増幅流路部 207 を流れることで、95℃-55℃ の温度変化を繰り返し受けるため、PCR 反応により再び増幅する。第二増幅流路 207 を経た反応液は第二合流部 208 を通過することで再び混合され、図 3 の検出部 209 まで流れる（図 23）。検出窓 213 にて反応液中の増幅した核酸を光学機器（図示せず）により、検出する。検出部 209 を備えた化学分析装置としても増幅した核酸を分析することができ精度の高い分析ができる。

【0044】

また、本実施例によれば、温度設定の可能な核酸増幅流路を複数の流路に分岐させることで、反応液が、流路方向に広がり、複数の温度域にまたがって流動することを防ぐ。このため、反応液が複数の温度域に存在する時間を短縮させることができ、反応液に生じる温度の不均一性を軽減する。さらに、反応液の接触面積を上げるため、反応液の熱伝達の効率が向上し、反応液の加熱および冷却に必要な時間を短縮することができるため、反応時間の短縮につながる。また、分岐した流路を再び合流することで、反応液を混合するため、増幅過程において各増幅流路ごとの反応液に生じる成分の不均一を解消することにより、増幅量を増大させる効果がある。

【0045】

また、温度変化の異なる複数の PCR サイクルを行い、適当な PCR サイクルを調べる第一段階 PCR 反応と、反応液を再び混合、均一化したのち、適当な PCR サイクルにて、PCR 反応を行う第二段階 PCR 反応を一貫して行うことが可能であ

るため、適したPCRサイクルがわからない鋳型核酸においても、増幅することが可能である。

【0046】

このように、本発明の実施例によれば、温度設定が可能な微小流路を複数の流路に分岐させることで、反応液が流路方向に広がりすぎることをふせぐことができる。このため、反応液が複数の温度域にまたがって流動することを防ぎ、反応液に生じる温度の不均一性を軽減する。さらに、反応液の接触面積を増えるため、反応液の熱伝達の効率が向上し、反応液の加熱および冷却に必要な時間を短縮することができるため、反応時間の短縮につながる。また、分岐した流路を再び合流することで、反応液を混合するため、増幅過程において各増幅流路ごとの反応液に生じる成分の不均一を解消することにより、増幅量を増大させる効果がある。

【0047】

また、適当なPCRサイクルを調べる工程と、適当なPCRサイクルでPCR反応を行う工程を一貫して行うことが可能であるため、適したPCRサイクルがわからない鋳型核酸においても、増幅することが可能である。

【0048】

(実施例2)

次に、PCR増幅反応の過程で、PCR反応液に鋳型核酸を含まないPCR増幅液を追加するときの実施例を示す。

【0049】

本実施例においても、実施例1で使用した遺伝子分析装置1（図1）を使用する。

図24から図25を用いて、核酸増幅チップ10の構造を説明する。
核酸増幅チップ105も実施例1と同様に、使用する試薬を流動させるための溝を刻んだ流路部2000（図24）と、流路部20の流路の温度を制御するための温度制御部3000（図25）を接合して構成する。

【0050】

流路部2000は、試薬注入部2005、第一分岐部2035、第一増幅流路

部 2045、第一合流部 2055、第二分岐部 2065、第二増幅流路部 2075、第二合流部 2085、第三分岐部 2095、第三増幅流路部 2105、第三合流部 2115、第一増幅液注入流路 2125、第二増幅液注入流路 2135、検出部 2145 を構成する溝を温度制御部 3000 との接触面側に持つ。検出を行うための光学窓 2155 を温度制御部 3000 との接触面と反対側に備える。

【0051】

温度制御部 3000 は、第一増幅流路部 2045 を加熱するための第一熱変性ヒーター 3005 および第一アニーリングヒーター 3015、第二増幅流路部 2075 を加熱するための第二熱変性ヒーター 3025 および第二アニーリングヒーター 3035、第三増幅流路部 2105 を加熱するための第三熱変性ヒーター 3045 および第三アニーリングヒーター 3055、を流路部 20 との接触面側に備え、それぞれのヒーターは温度センサー（図示せず）を備えている。それぞれの増幅流路とヒーターと温度センサーは電極端子 3065 を介して図 1 の遺伝子増幅装置 1 とつながり、ヒーターの温度は遺伝子増幅装置 1 のパネル 42 により、自由に設定することができる。また、温度制御部 3000 は反応液注入口 3075、洗浄液注入口 3085、廃液口 3095、第一増幅液注入口 3105、第二増幅液注入口 3115 となる貫通孔も備える。

【0052】

以下、核酸増幅チップ 10 内の流路を試薬が流動することで、目的の遺伝子を増幅し、検出する実施例を、図 26 から図 29 を用いて示す。増幅および検出動作の流れを図 26 に示す。

【0053】

はじめに、核酸増幅チップ 105 の温度制御部 3000 の反応液注入口 3075 から、鋳型となる DNA を含む反応液 2115 を注入する。さらに、第一増幅液注入口 3105、第二増幅液注入口 3115 から鋳型となる DNA を含まない反応液 211 を注入する。反応液は、DNA Polymerase、2 種類のプライマー、dNTP、金属イオン、緩衝液、増幅した DNA を検出するための蛍光色素を含んでいる。蛍光色素は例えば Cyber Green (Molecular Probe 社) を使用する。反応液を注入した核酸増幅チップ 105 を遺伝子分析装置 1 の設置台 405 に設置する。設置後

、核酸増幅チップ 1 0 の温度制御部 3 0 0 0 のヒーターの温度を設定する。例えば、第一熱変性ヒーター 3 0 0、第二熱変性ヒーター 3 0 2 5、第三熱変性ヒーター 3 0 3 5 は熱変性のために 9 5℃、第一アニーリングヒーター 3 0 1 5 と第二アニーリングヒーター 3 0 3 5 と第三アニーリングヒーター 3 0 5 5 はアニーリングのために 5 5℃に設定する。

【0 0 5 4】

設置後の核酸増幅チップ 1 0 5 と設置台 4 0 5 の関係を図 2 7 に示す。核酸増幅チップの電極端子 3 0 6 5 を設置台 4 0 5 の設置台電極端子 4 5 5 に取り付け、反応液注入口 3 0 7 5 に反応液注入口バルブ 4 6 5 を、洗浄液注入口 3 0 8 5 に洗浄液注入用バルブ 4 7 5 を、廃液口 3 0 9 5 に廃液口バルブ 4 8 5 を、第一増幅液注入口 3 1 0 5 に第一増幅液注入口バルブ 4 9 5 を、第二増幅液注入口 3 1 1 5 に第二増幅液注入口バルブ 5 0 5 を取り付ける。また、タンク 4 3 5 に洗浄液を入れる。反応液や洗浄液の流動はポンプ 4 3 5 による圧力と各バルブ 4 6 5、4 7 5、4 8 5、4 9 5 の開閉により制御され、核酸増幅チップ 1 0 の流路を通過し、目的遺伝子を増幅・検出した後、廃液口 2 0 2 を通過し、廃液容器 5 1 に廃棄される。洗浄液には TE バッファーなどを用いる。

以下、鋳型となる核酸を含む反応液を核酸増幅チップ 1 0 5 内の流路に流動させることで、P C R 反応により DNA を増幅する過程を説明する。

【0 0 5 5】

核酸増幅チップ 1 0 5 に注入した反応液は、実施例 1 および 2 と同様にポンプ 4 3 5 と、反応液注入口バルブ 4 6 5、洗浄液注入用バルブ 4 7 5、廃液口バルブ 4 8 5 の開閉により、図 2 4 の流路部 2 0 0 0 における試薬注入部 2 0 0 5、第一分岐部 2 0 1 5、第一増幅流路部 2 0 2 5、第一合流部 2 0 3 5 を流動する。このとき第一増幅液注入口バルブ 4 9 5 と第二増幅液注入口バルブ 5 0 5 は閉じている。

【0 0 5 6】

図 2 8 は、第一増幅流路部 2 0 2 5 における温度制御部 3 0 0 0 の第一熱変性ヒーター 3 0 0 5 と第一アニーリングヒーター 3 0 1 5 との対応を示すものである。実施例 1 で用いた核酸増幅チップ 1 0 と同様に、第一増幅流路部 2 0 2 5 の

各流路は、95℃に設定した第一熱変性ヒーター3005上と55℃に設定した第一アニーリングヒーター3015上を交互に通過する。等量に分かれた反応液は、第一分岐部2015を通過し、第一増幅流路部2025に分離した後、第一増幅流路部2025を流れることで、95℃の温度域と55℃の温度域を交互に通過するため、反応液はPCR反応に必要な温度変化を受け、増幅する。また、図24における第二増幅流路部2075と第二熱変性ヒーター3025および第二アニーリングヒーター3035の位置関係、第三増幅流路部2105と第三熱変性ヒーター3045および第三アニーリングヒーター3055の位置関係も第一増幅流路部2025と第一熱変性ヒーター3005および第一アニーリングヒーター3015との位置関係と同じため、反応液が第二増幅流路部、第三増幅流路部を通過したときには、反応液は同様の温度変化を請けるため反応液中の核酸は増幅する。

【0057】

第一合流部2055を通過した反応液が第二合流部2065に流動するとき、図29に示すように、反応液2205に増幅液を追加し、混合する。追加の動作は、図27に示す第一増幅液注入口バルブを495開き、ポンプ435による圧力により行う。

【0058】

新たに増幅液が追加された反応液は、図24の第二分岐部2065、第二増幅流路2075、第二合流部2085を通過する。反応液は第二増幅流路2075を通過するときに、第一増幅流路2045を通過する時と同様に、95℃-55℃の温度変化を受けるためPCR反応により鋳型核酸は増幅する。さらに反応液は流動し、第三合流部2095に流動するときに、図27に示す第二増幅液注入口バルブ505を開き、新たに増幅液を追加する。新たに増幅液が追加された反応液は、第三分岐部2095、第三増幅流路2105、第三合流部2115を通過する。第三増幅流路2105を通過するときに、第一増幅流路2045を通過する時と同様に95℃-55℃の温度変化を受けるためPCR反応により鋳型核酸は増幅する。

反応液は検出部2145に流動し、増幅した核酸を検出窓2155より光学機

器を用いて検出する。

【0059】

このように、増幅する工程の間に増幅液等の試薬を追加する流路を備えることを特徴とする。

【0060】

また、試薬が複数の温度域を通過する流路を流動しているときに、流動している新たに試薬を追加できる構造を持つ。また、目的の核酸を増幅する試薬を複数の温度域を通過する流路に流動させる過程で、上記試薬を混合することを特徴とする核酸増幅方法を提供することで解決できる。

【0061】

本実施例によれば、PCR反応の過程で不足した基質や失活したDNAポリメラーゼを補うために新たに増幅液を追加しているため、基質の不足やDNAポリメラーゼの失活による鋳型核酸の増幅量の低下を抑えることができる。

【0062】

【発明の効果】

本発明により、増幅効率の高い核酸増幅装置を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の実施例による遺伝子分析装置の全体構成図である。

【図2】 本発明の実施例による遺伝子増幅チップの外観図である。

【図3】 本発明の実施例による遺伝子増幅チップの流路部の構成図である。

【図4】 本発明の実施例による遺伝子増幅チップの温度制御部の構成図である。

【図5】 本発明の実施例による遺伝子増幅チップの流路部と温度制御部の対応図である。

【図6】 本発明の実施例による遺伝子増幅チップの流路部の拡大図である。

【図7】 本発明の実施例による遺伝子増幅チップの組図の断面図である。

【図8】 本発明の実施例による動作手順を示す説明図である。

【図9】 本発明の実施例による遺伝子増幅チップの流路部の流動状態を示したものである。

【図 10】 本発明の実施例による遺伝子分析装置の流路対応図である。

【図 11】 本発明の実施例による遺伝子増幅チップの流路部の流動状態を示したものである。

【図 12】 本発明の実施例による遺伝子増幅チップの流路部の流動状態を示したものである。

【図 13】 本発明の実施例による遺伝子増幅チップの流路部の流動状態を示したものである。

【図 14】 本発明の実施例による遺伝子増幅チップの流路部の流動状態を示したものである。

【図 15】 本発明の実施例による遺伝子増幅チップの流路部の流動状態を示したものである。

【図 16】 本発明の実施例による遺伝子増幅チップの流路部の流動状態を示したものである。

【図 17】 本発明の実施例による遺伝子増幅チップの流路部の流動状態を示したものである。

【図 18】 本発明の実施例による遺伝子増幅チップにおける流路部の合流部と温度制御部の対応図である。

【図 19】 本発明の実施例による遺伝子増幅チップの流路部と温度制御部の対応図である。

【図 20】 本発明の実施例による遺伝子増幅チップの流路部の流動状態を示したものである。

【図 21】 本発明の実施例による遺伝子増幅チップの流路部と温度制御部の対応図である。

【図 22】 本発明の実施例による遺伝子増幅チップの流路部の流動状態を示したものである。

【図 23】 本発明の実施例による遺伝子増幅チップの流路部の流動状態を示したものである。

【図 24】 本発明の実施例による遺伝子増幅チップの流路部の構成図である。

【図 25】本発明の実施例による遺伝子増幅チップの温度制御部の構成図である

【図 26】本発明の実施例による動作手順を示す説明図である。

【図 27】本発明の実施例による遺伝子分析装置の流路対応図である。

【図 28】本発明の実施例による遺伝子増幅チップの流路部と温度制御部の対応図である。

【図 29】本発明の実施例による遺伝子増幅チップの流路部の流動状態を示したものである。

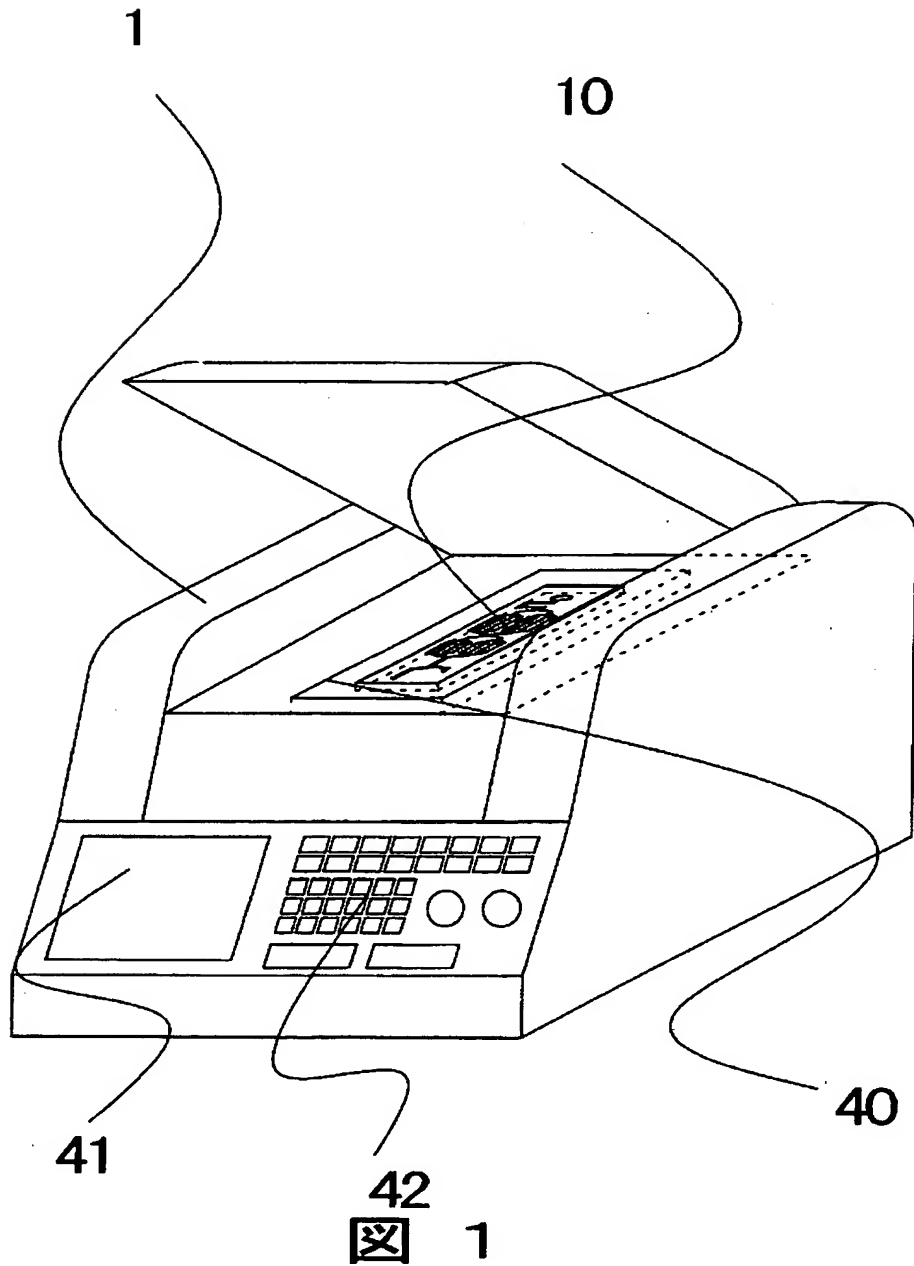
【符号の説明】

1・・・遺伝子分析装置、10・・・核酸増幅チップ、20・・・流路部、40・・・設置台、41・・・モニタ、42・・・パネル、200・・・試薬注入流路部、203・・・第一分岐流路部、204・・・第一増幅流路部、205・・・第一合流流路部、206・・・第二分岐流路部、207・・・第二増幅流路部、208・・・第二合流流路部、209・・・検出流路部

【書類名】

図面

【図 1】



【図 2】

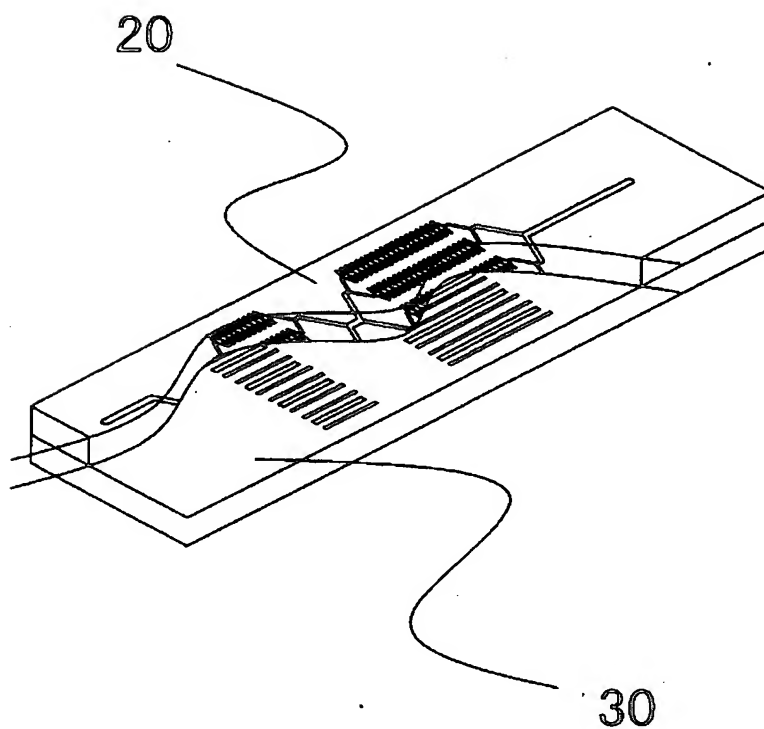


図 2

【図 3】

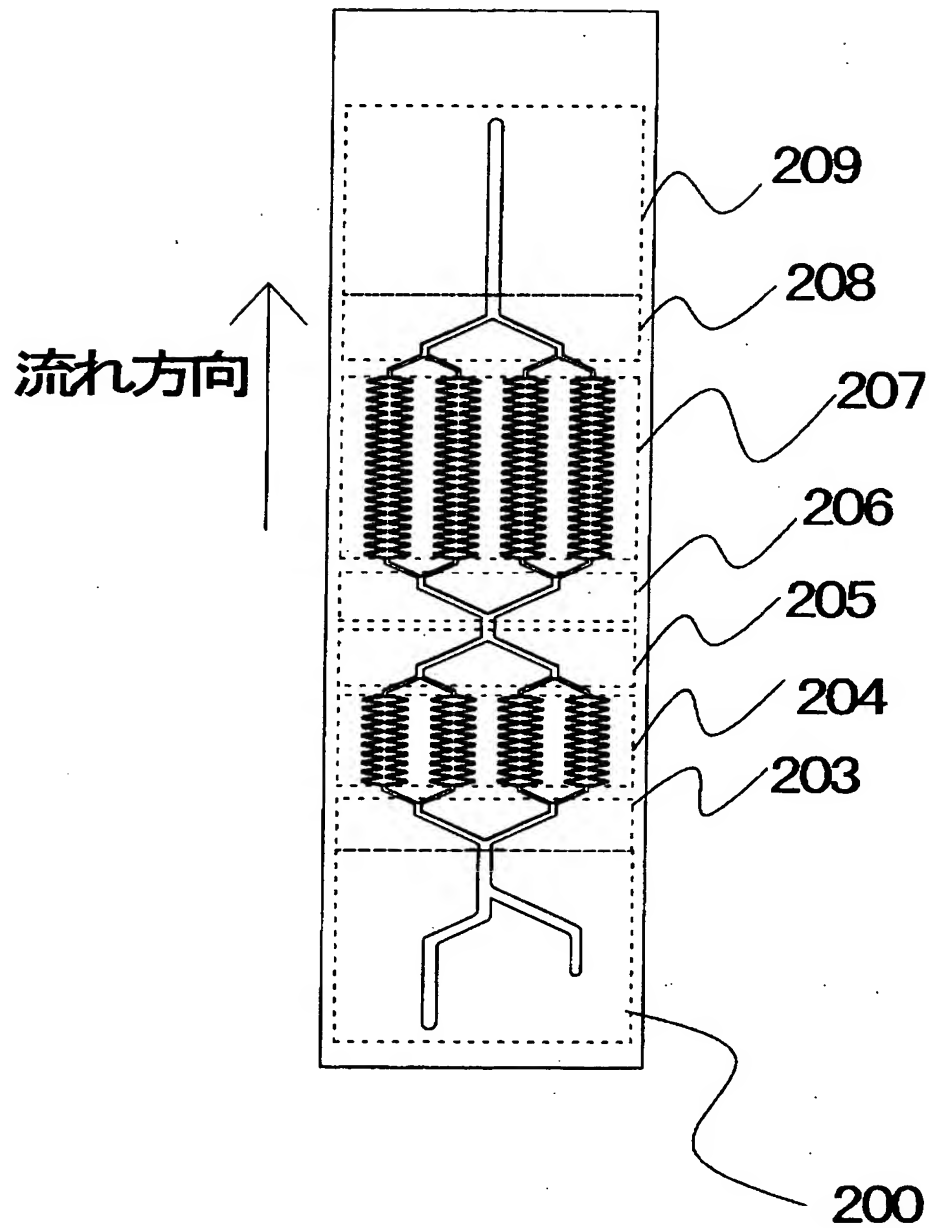


図 3

【図 4】

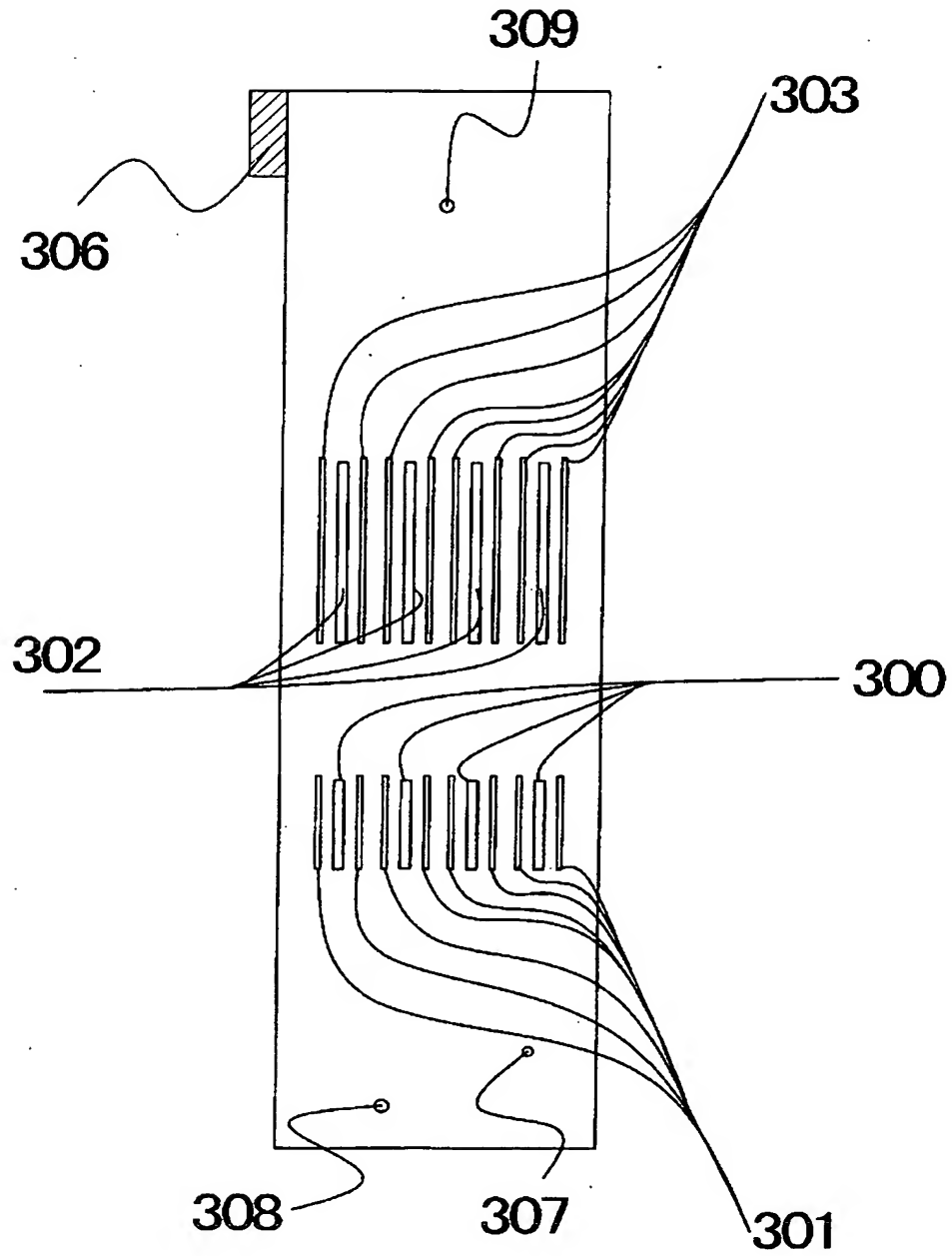


図 4

【図 5】

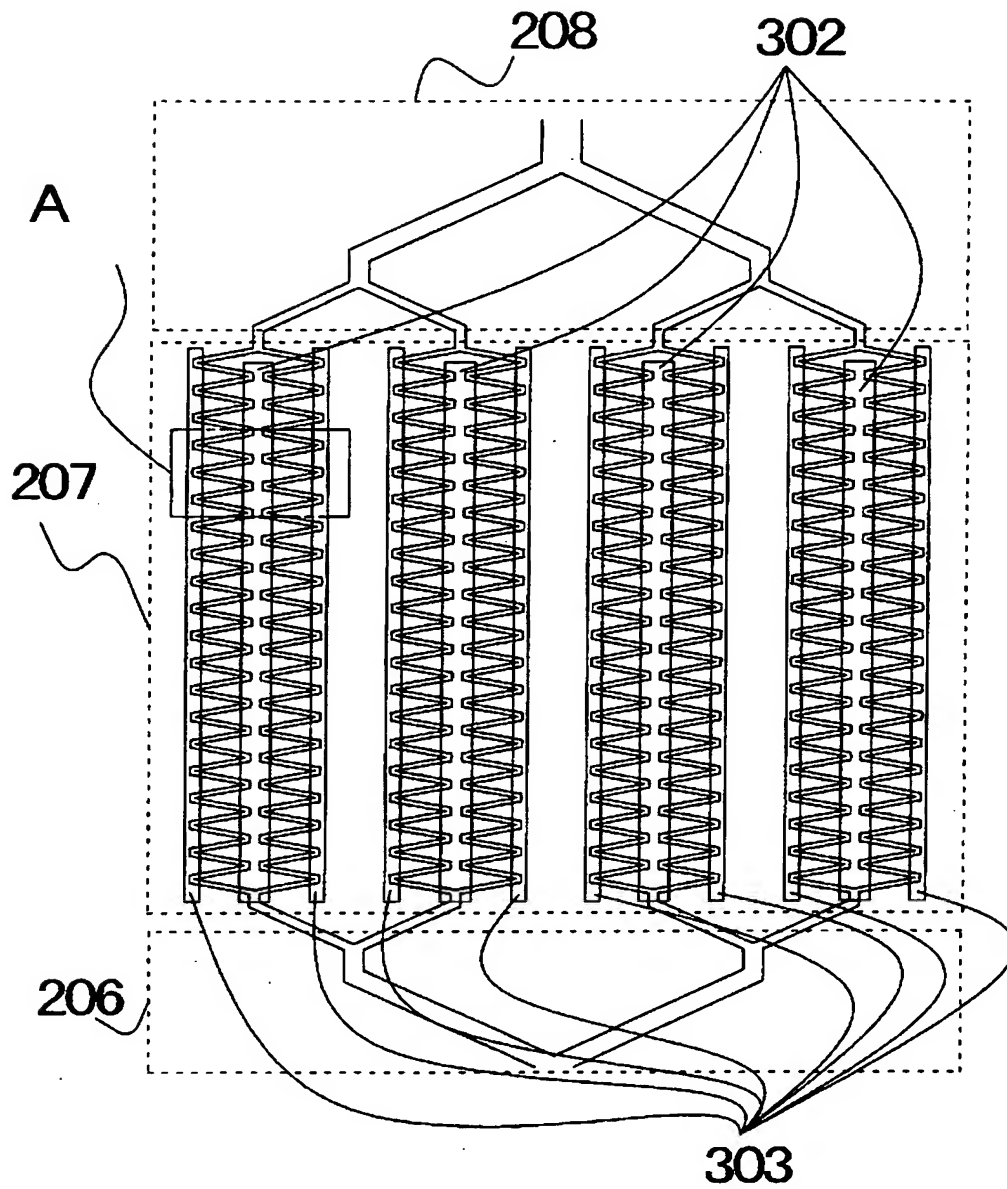


図 5

【図 6】

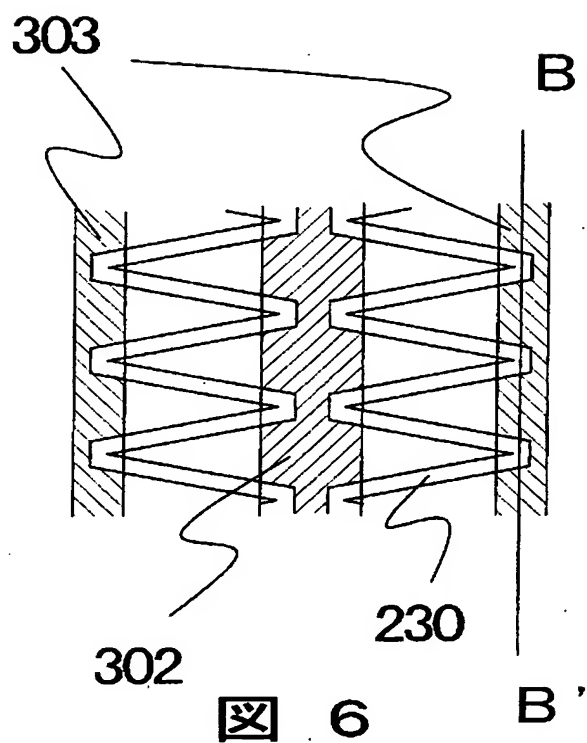


図 6

【図 7】

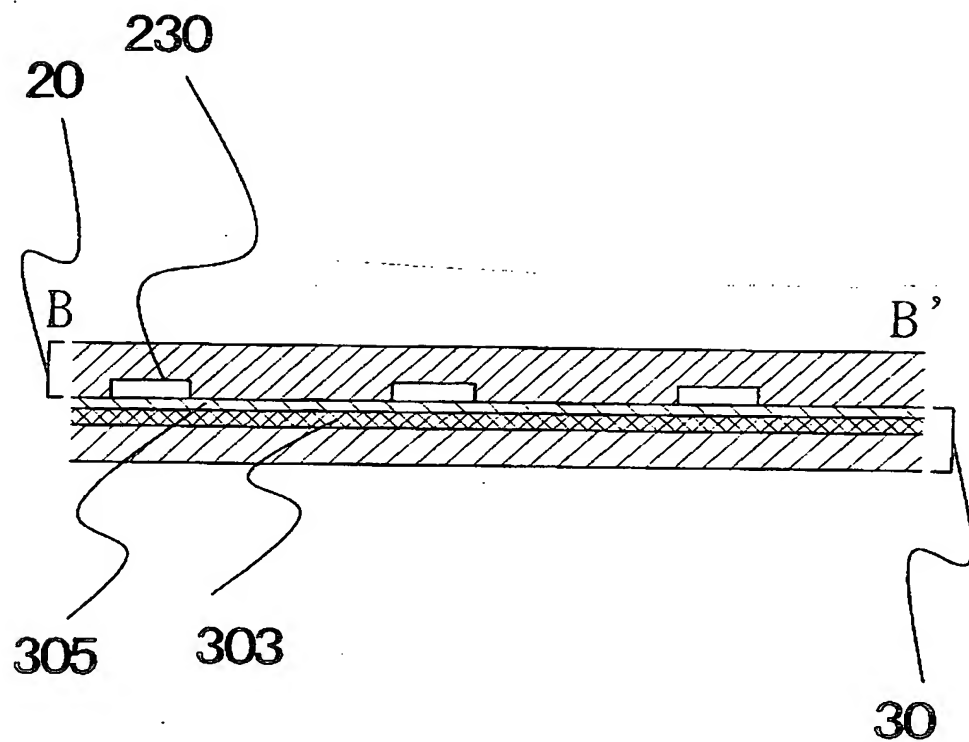


図 7

【図 8】

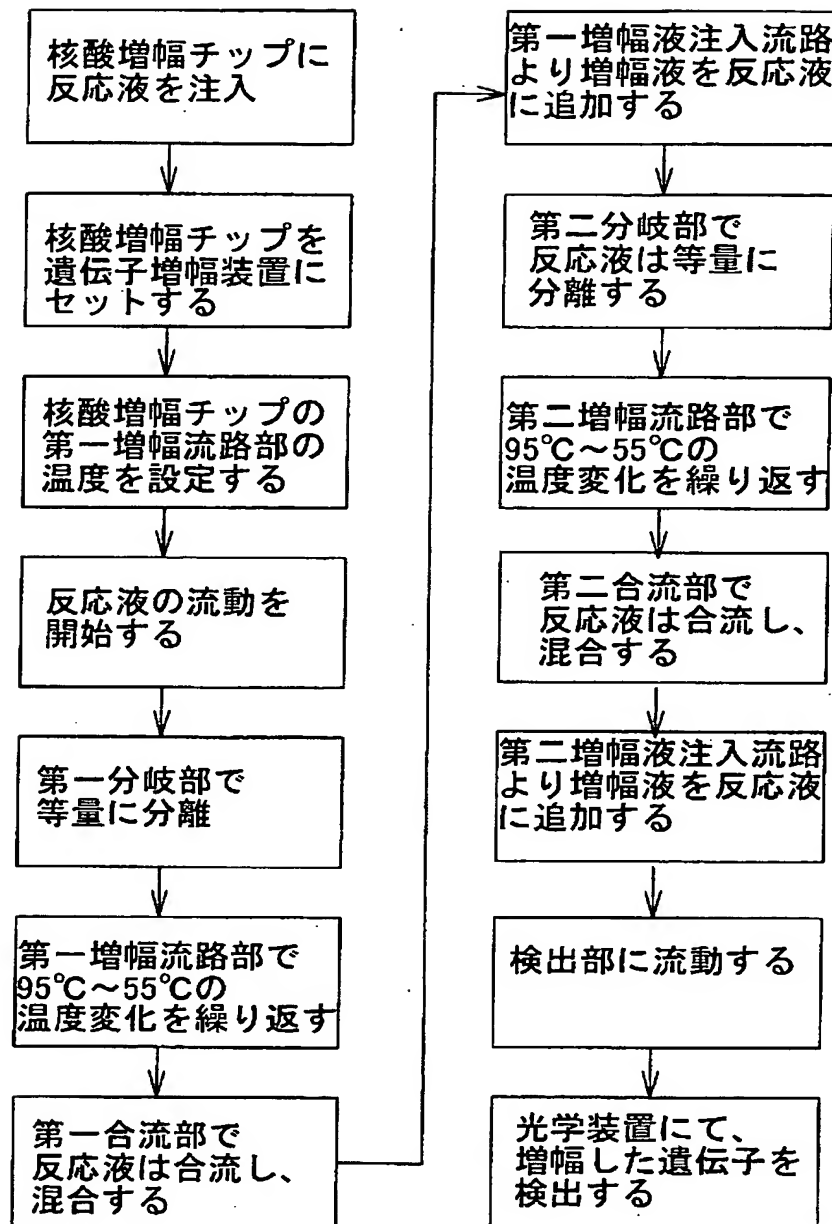


図 8

【図 9】

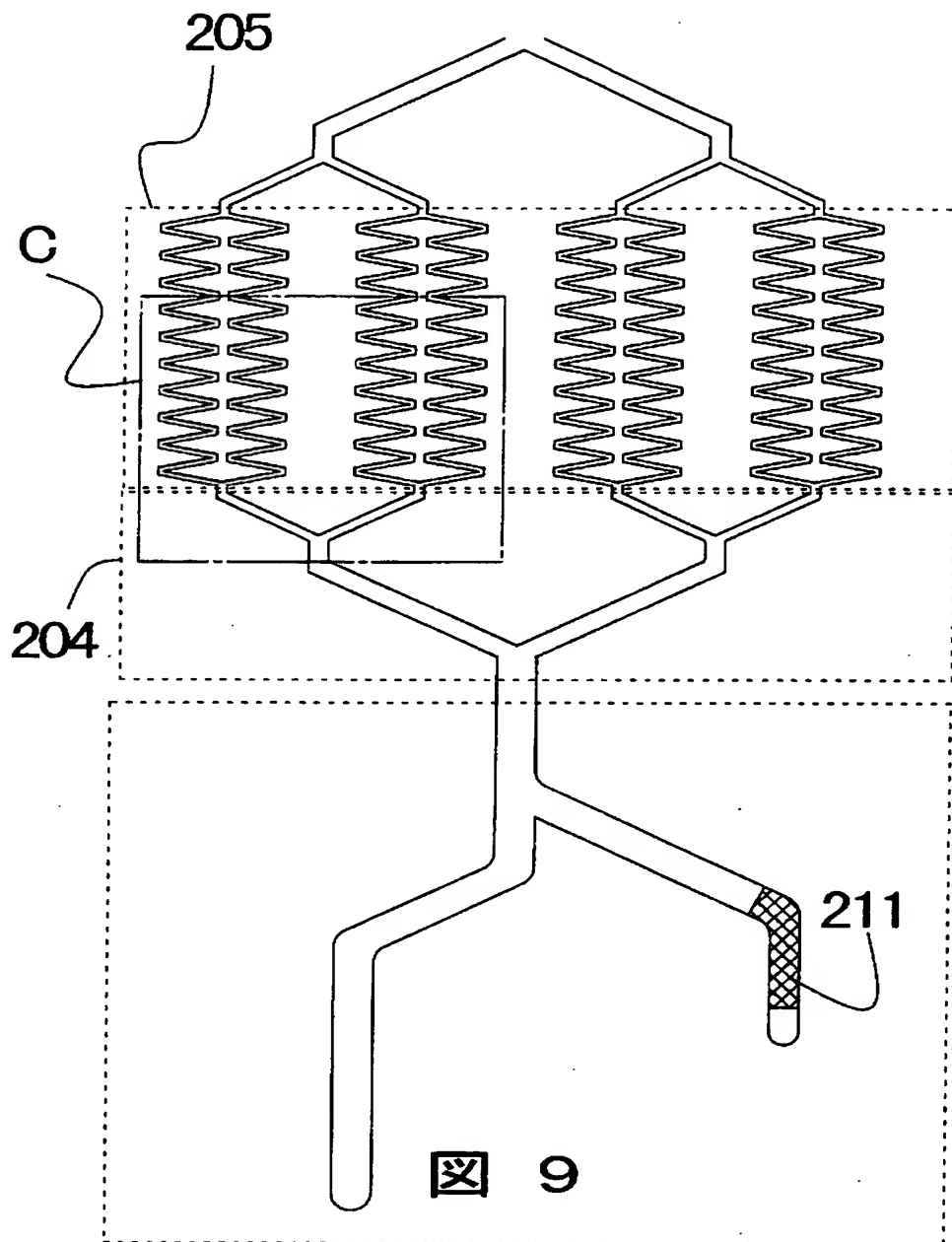


図 9

【図 10】

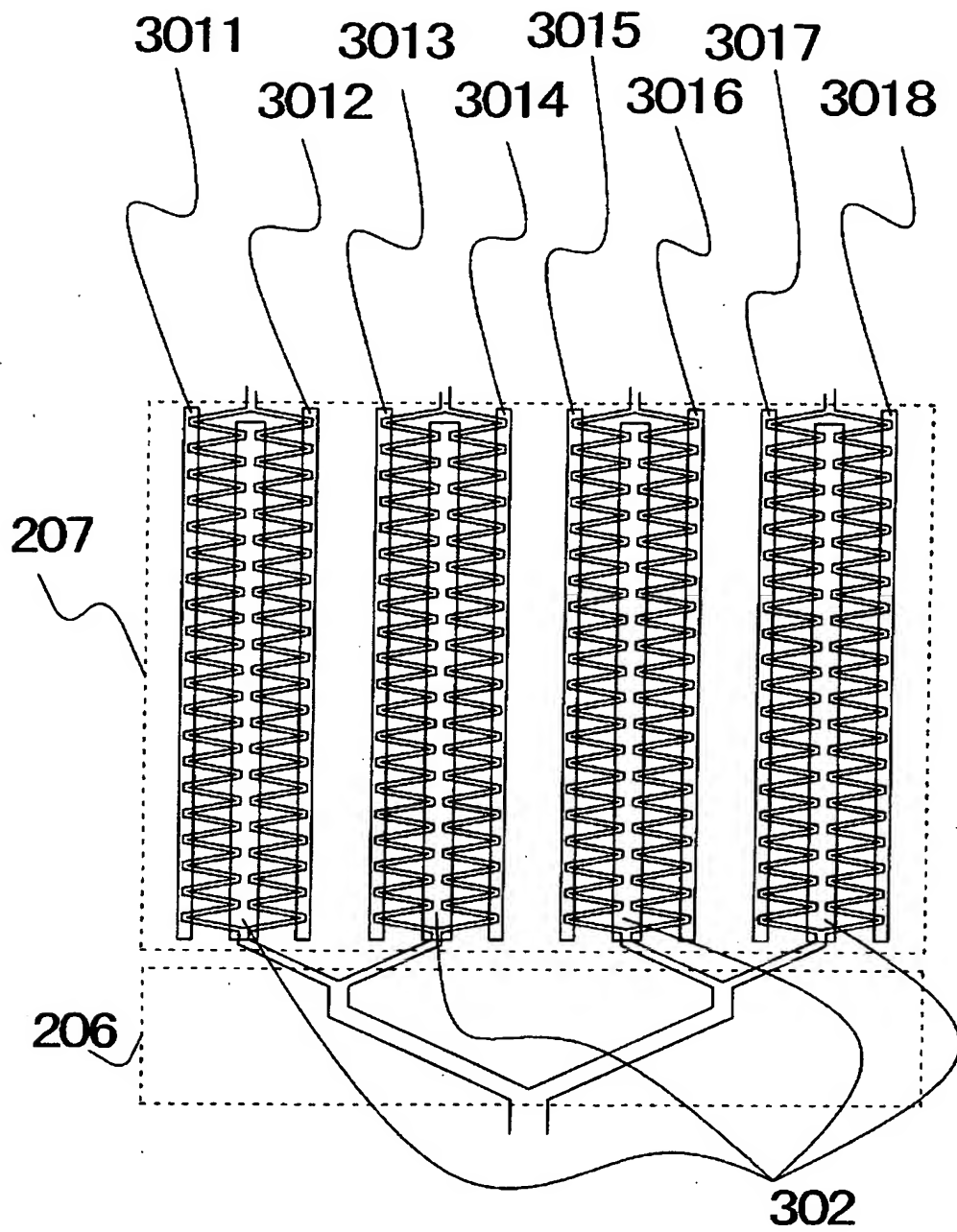


図 10

【図 11】

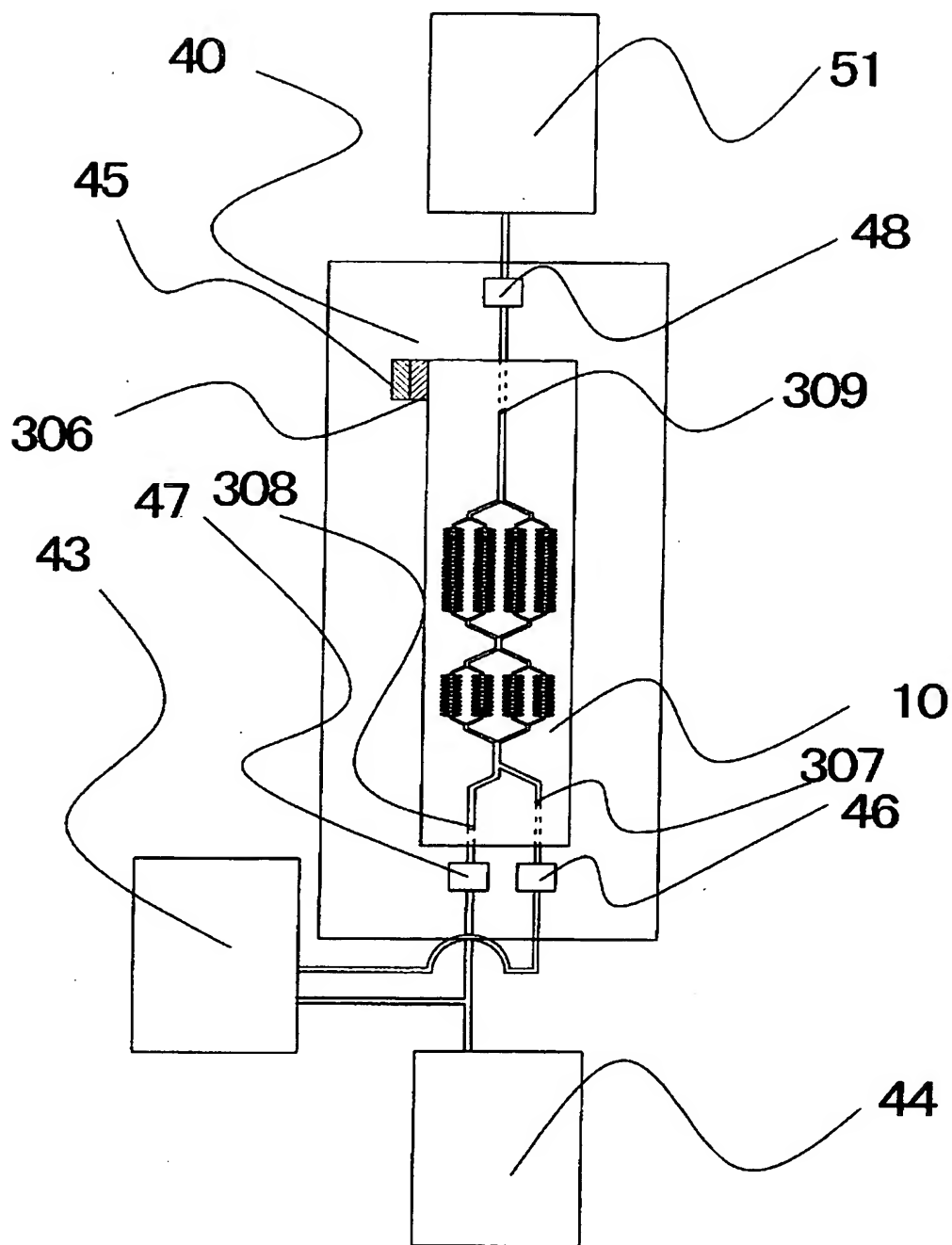
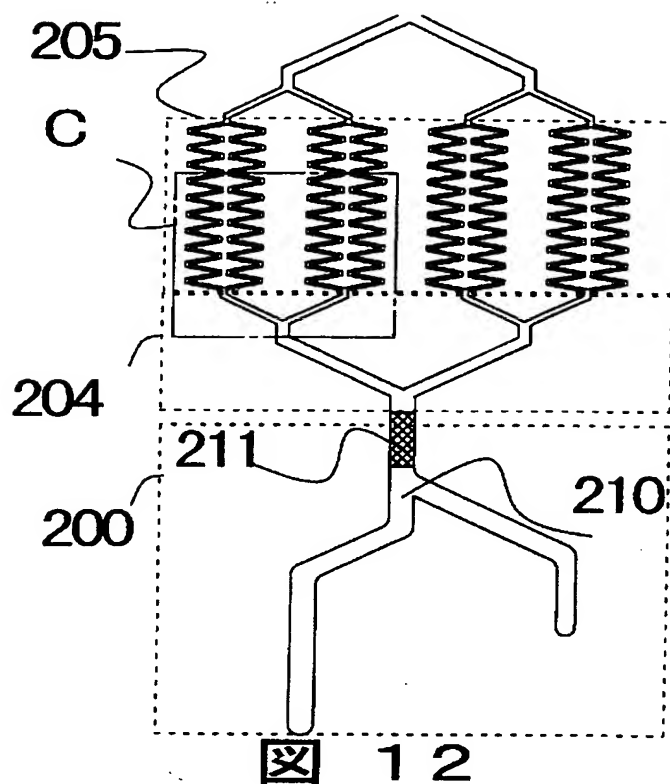


図 11

【図 12】



【図 13】

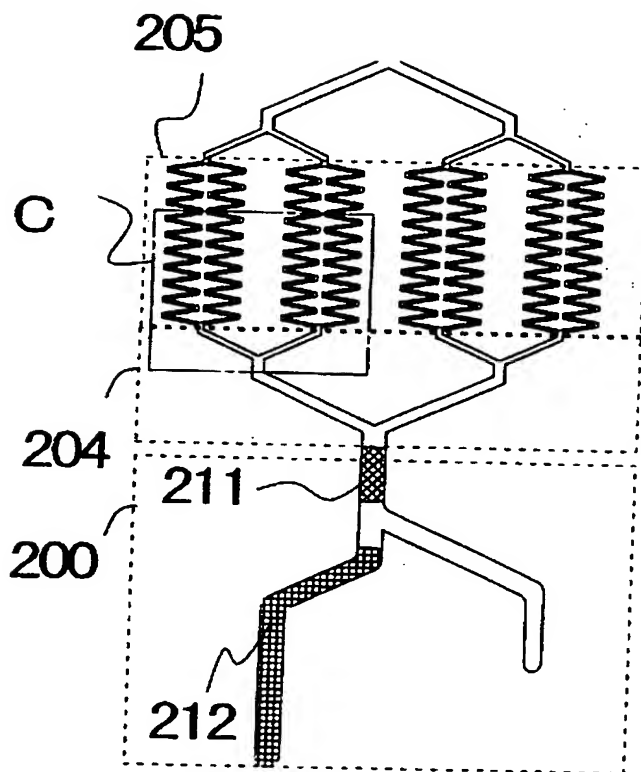


図 13

【図 14】

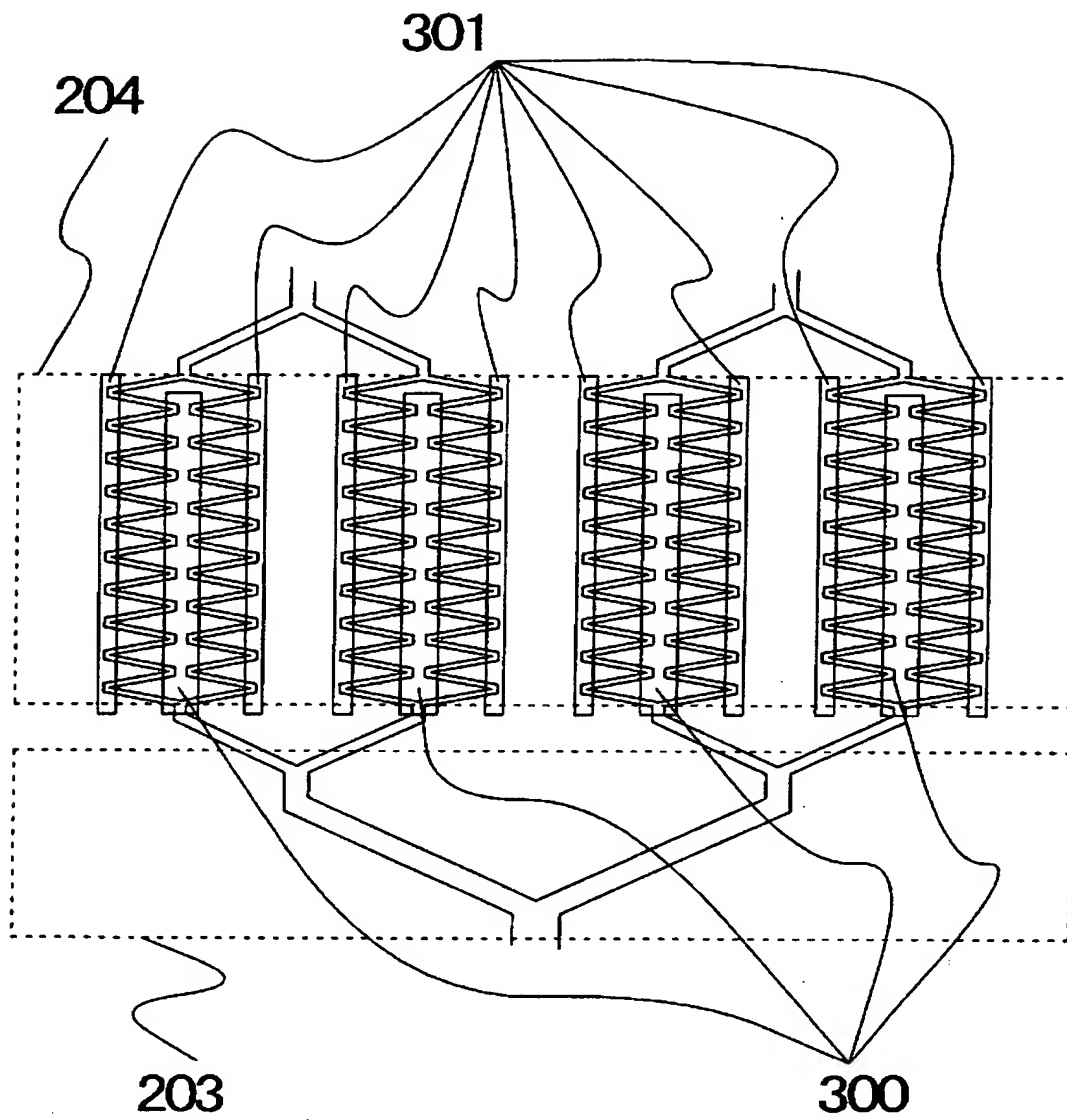


図 14

【図 15】

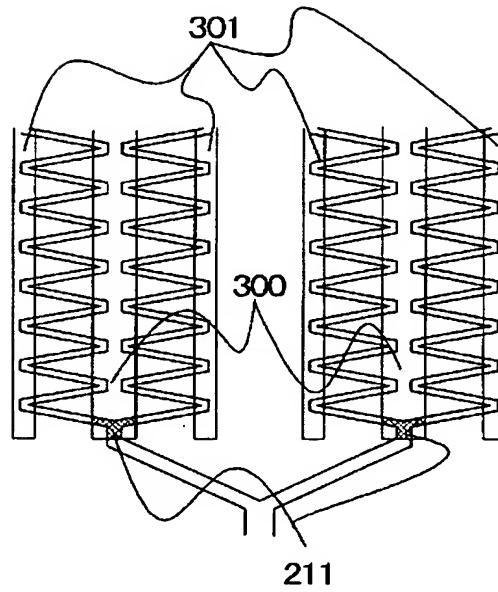


図 15

【図 16】

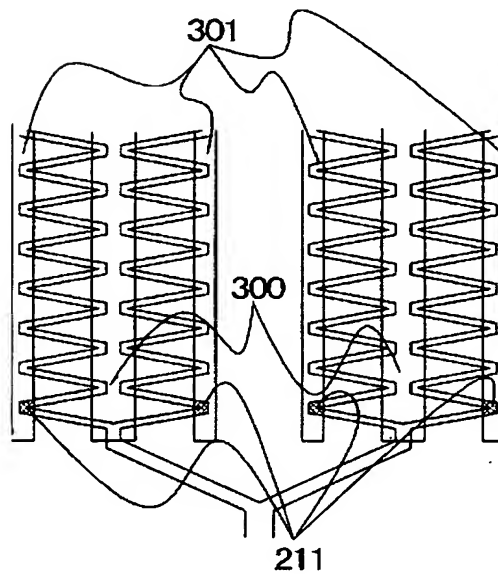


図 16

【図 17】

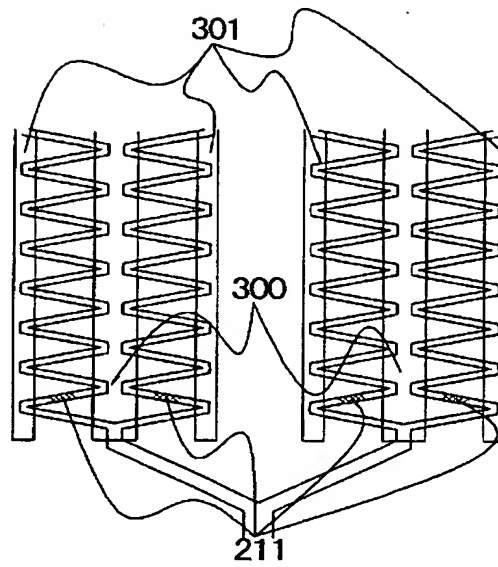


図 17

【図 18】

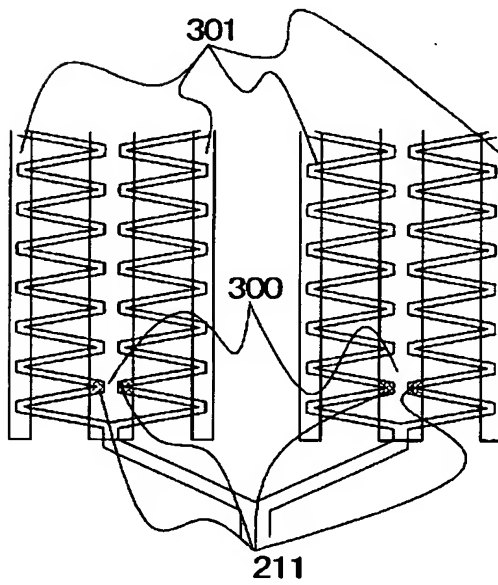


図 18

【図 19】

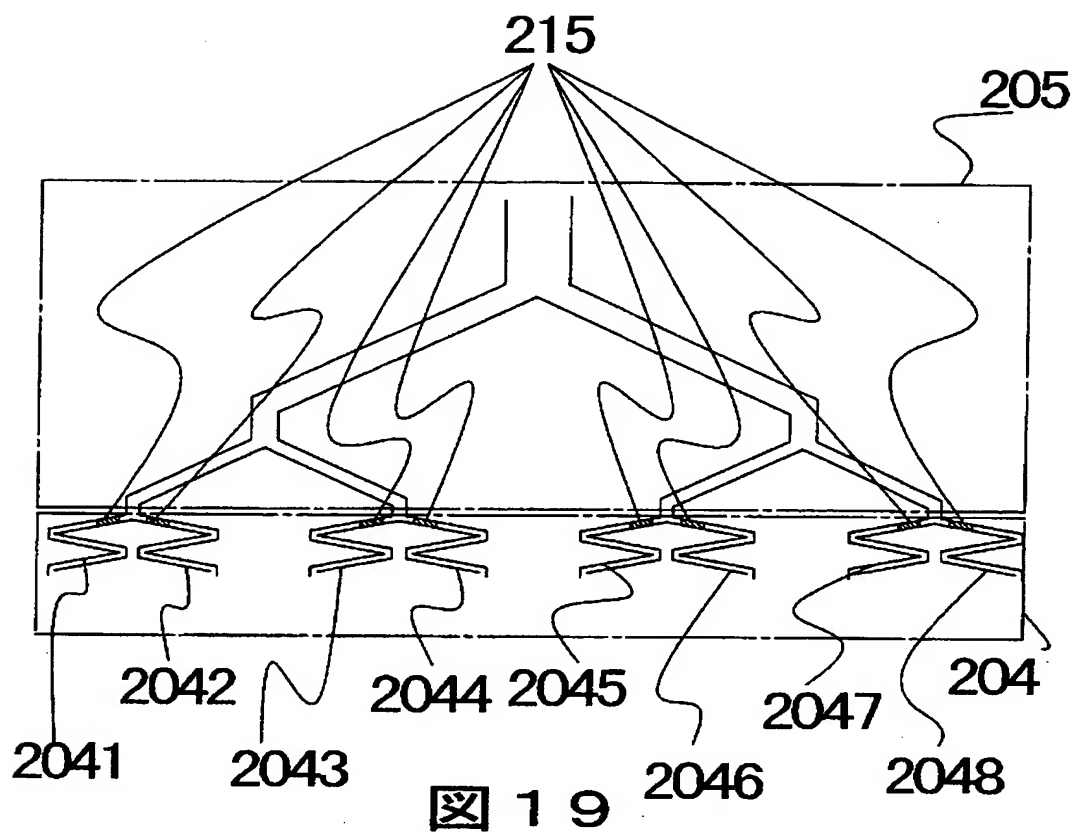


図 19

【図 20】

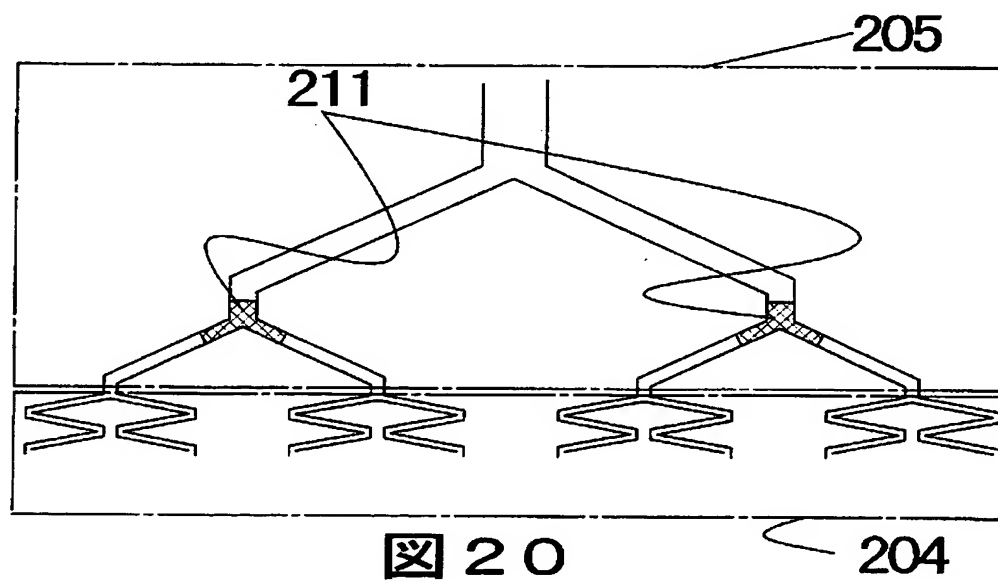


図 20

【図 21】

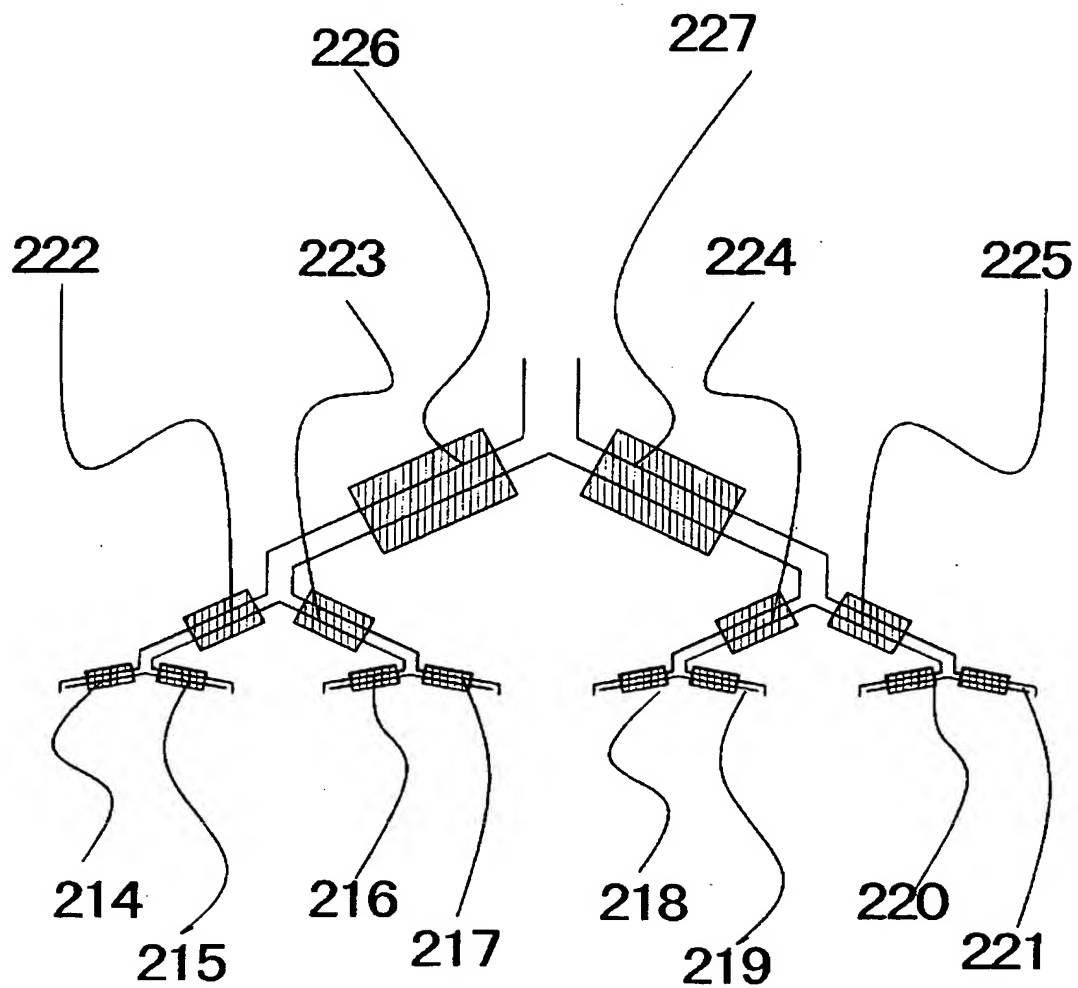


図 21

【図 22】

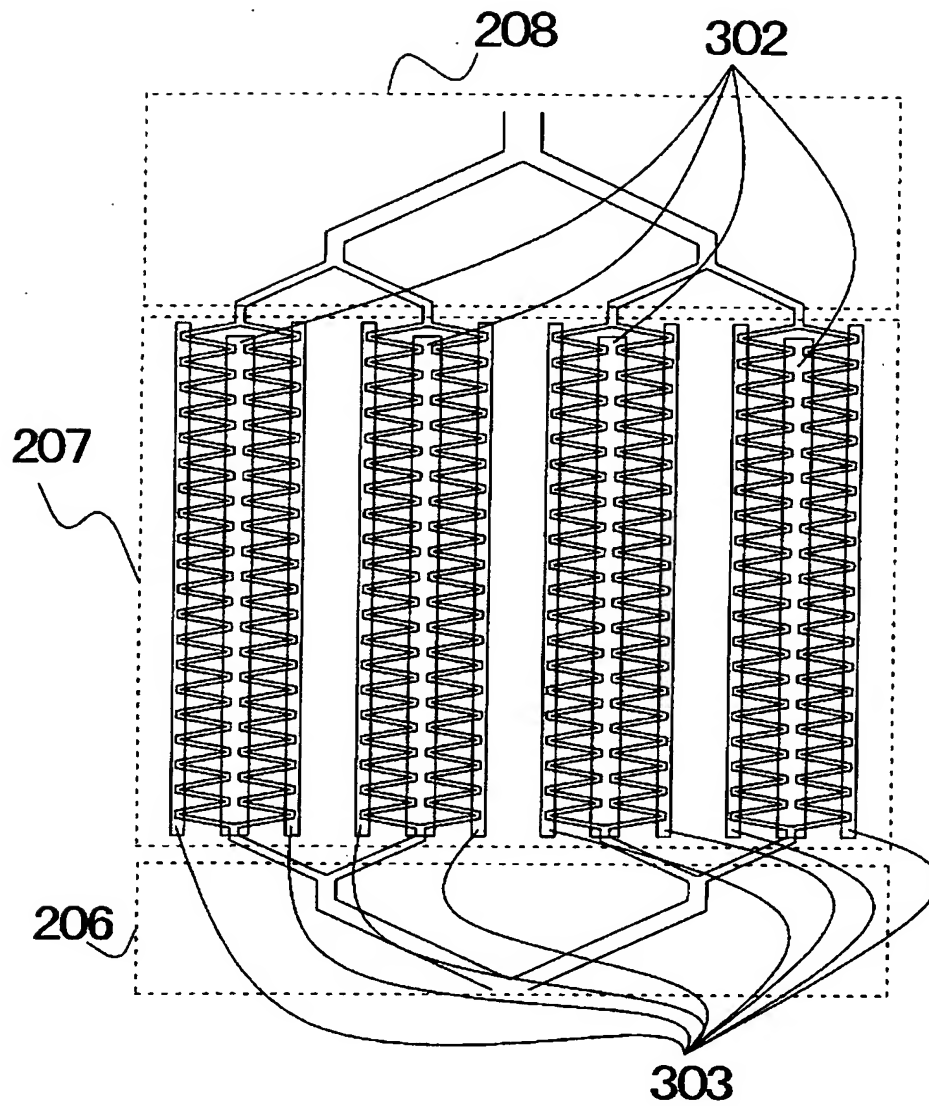
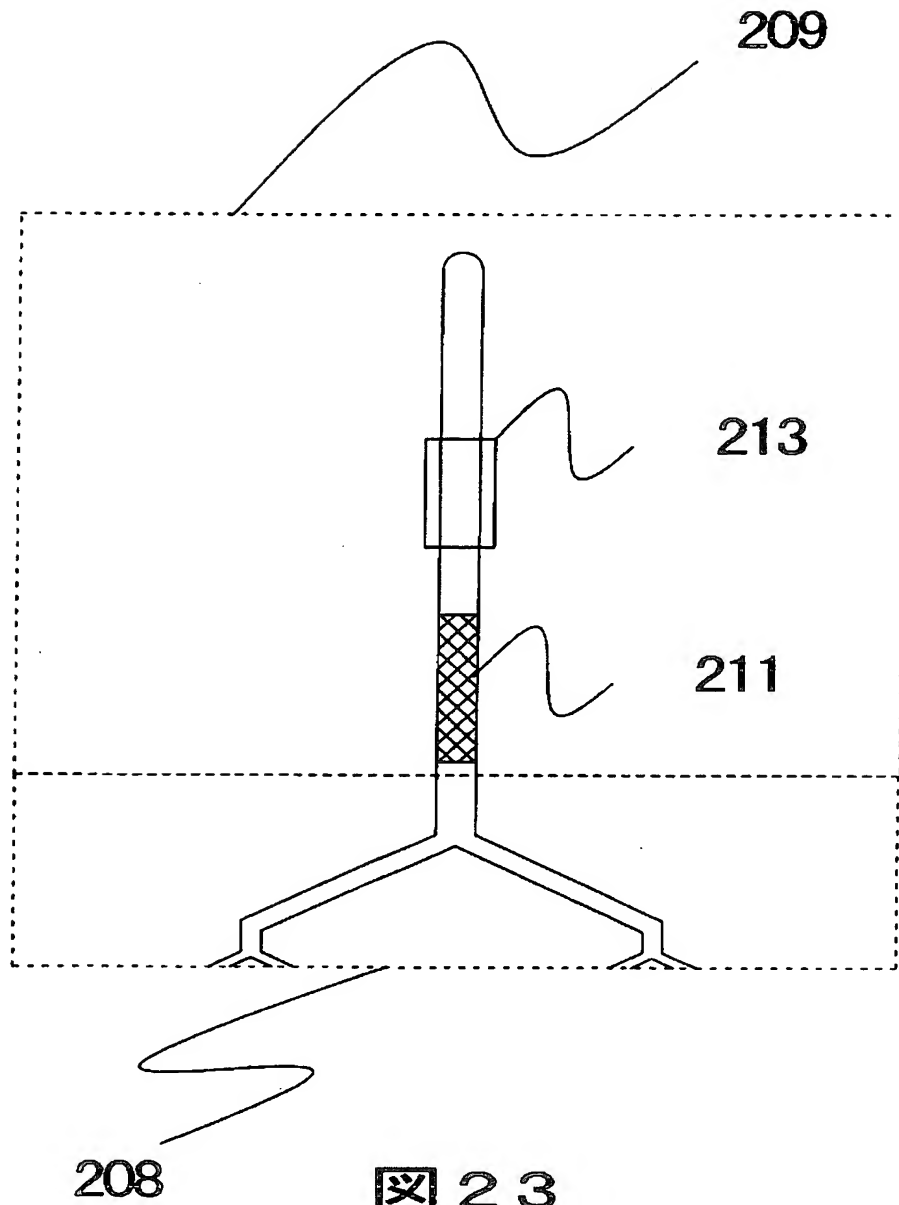


図 22

【図 23】



【図 24】

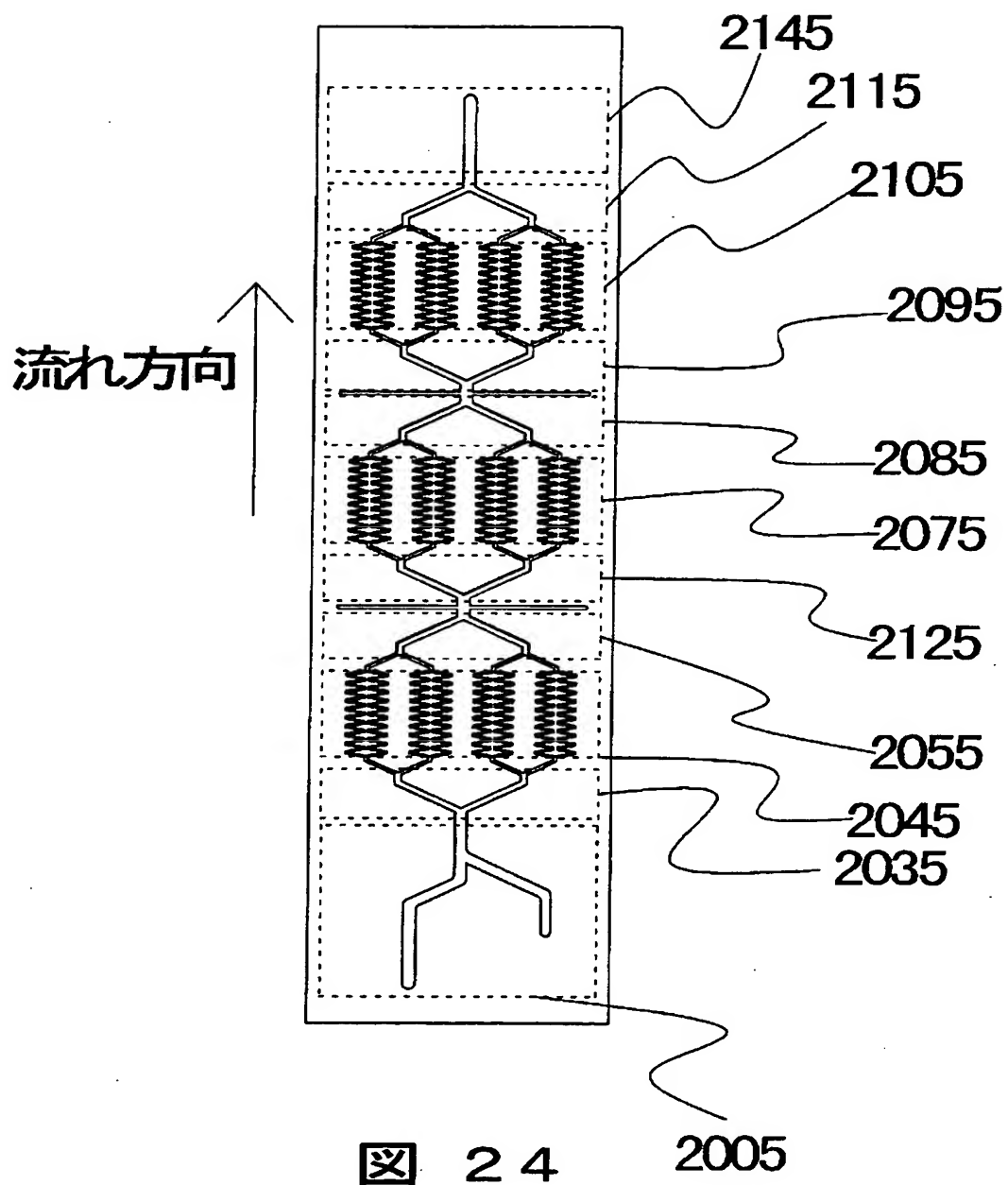


図 24

2005

【図 25】

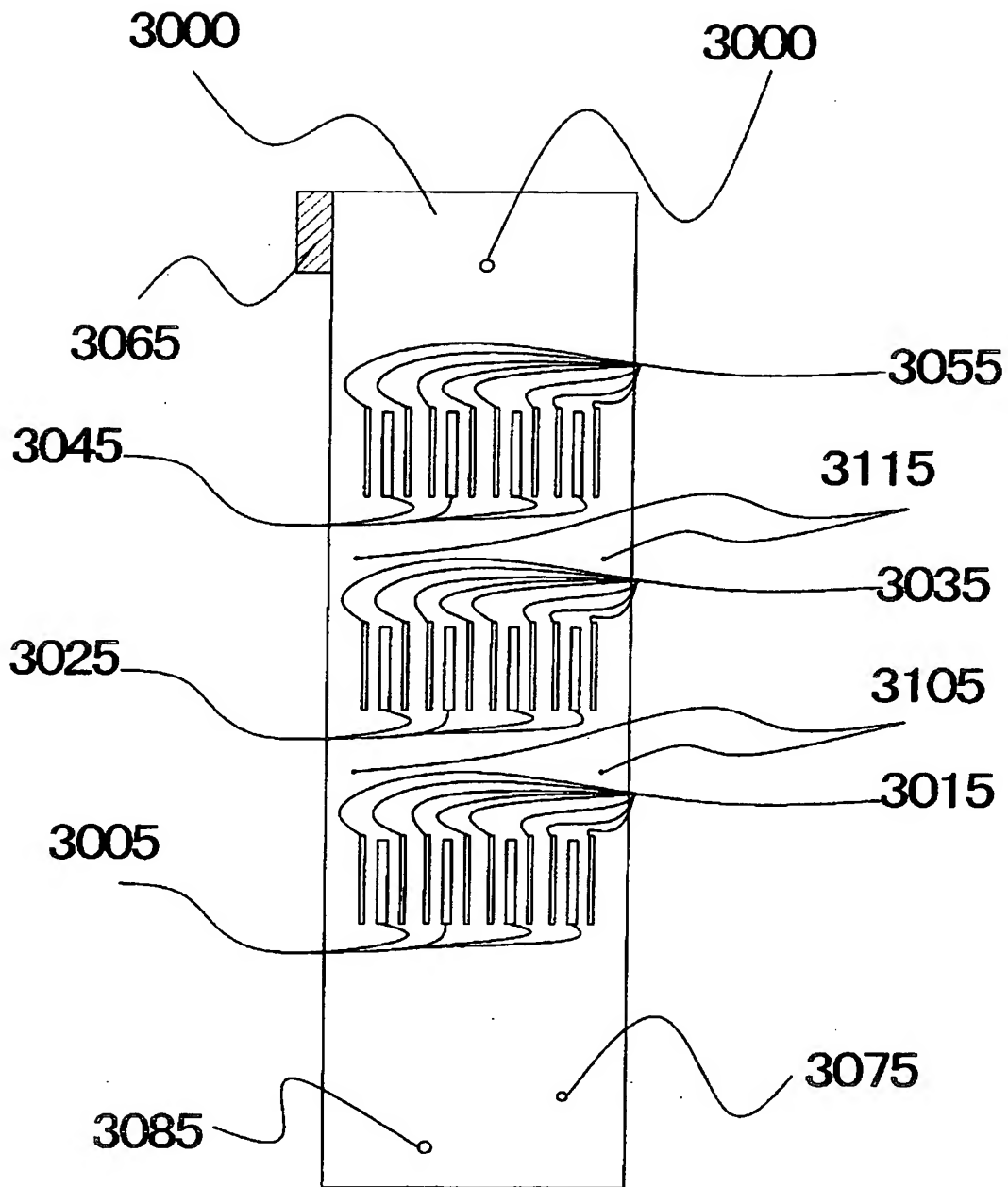


図 25

【図 26】

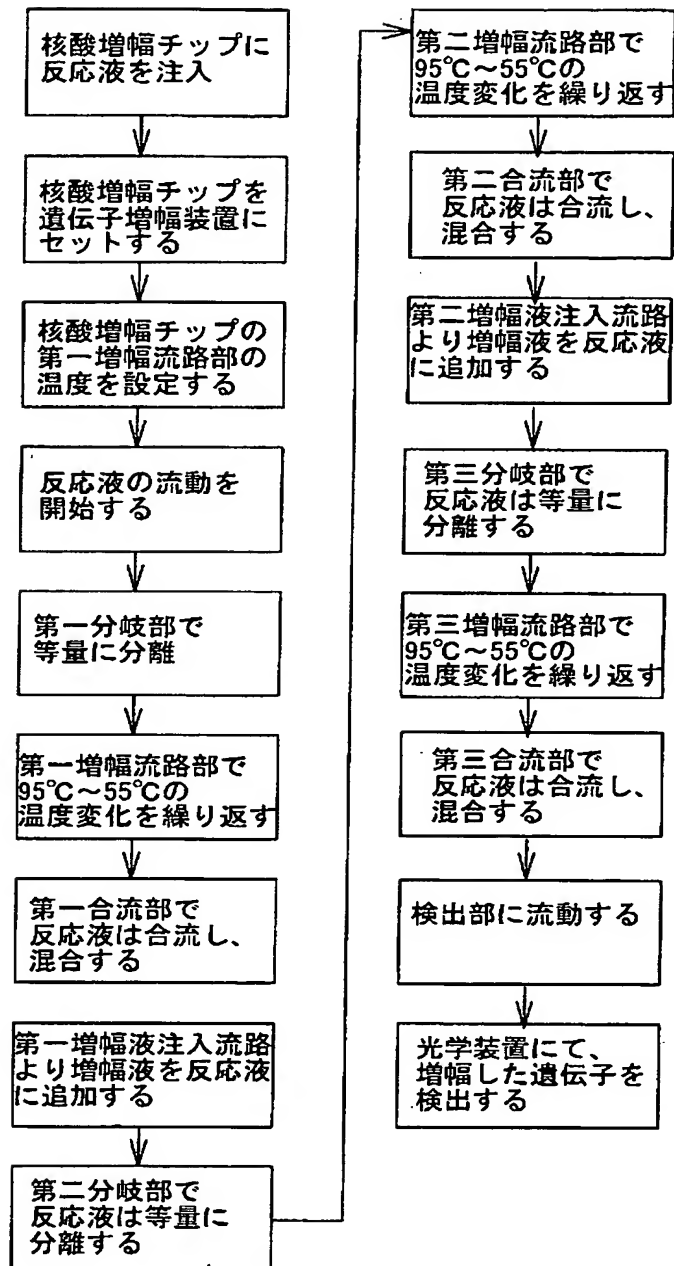


図 26

【図 27】

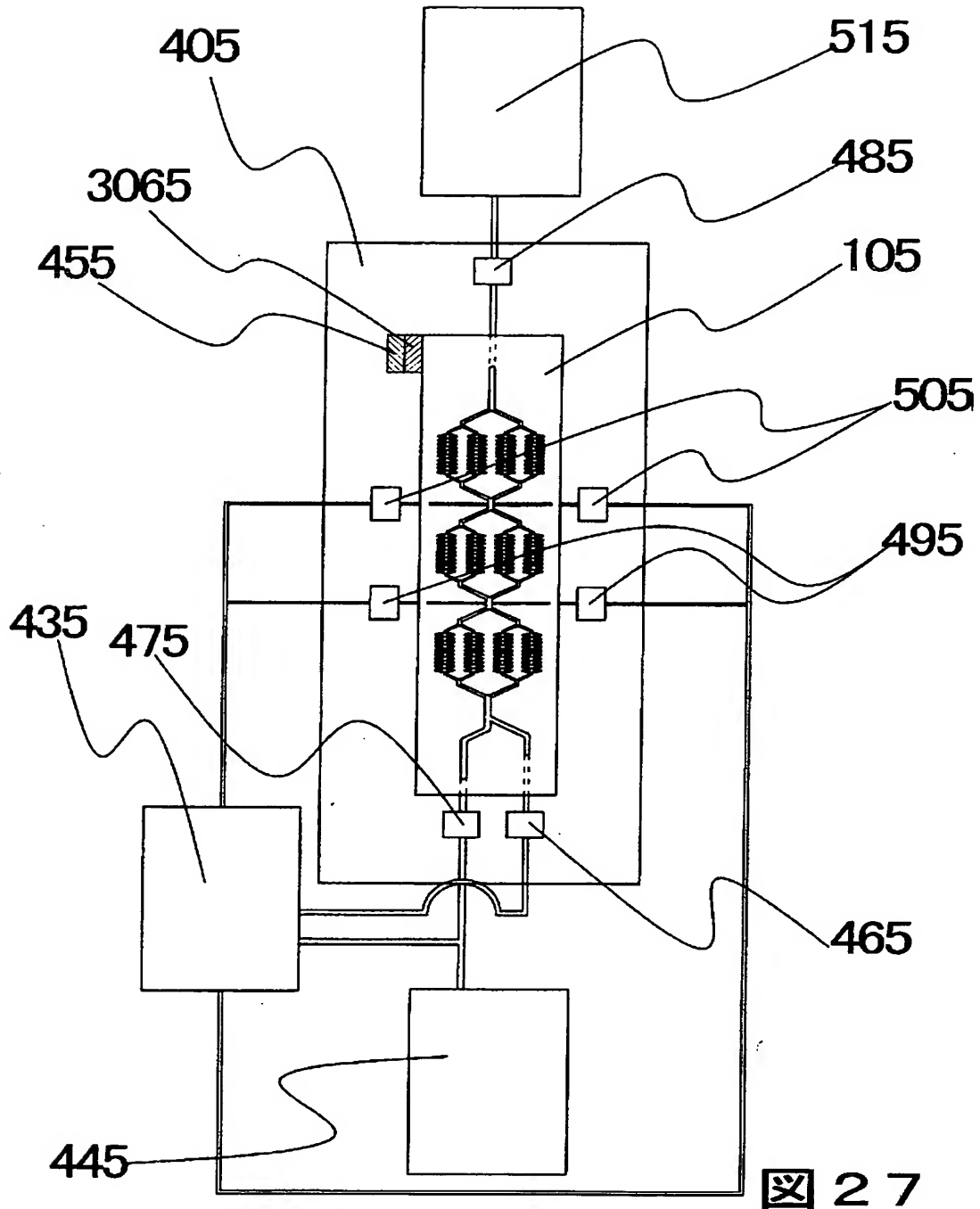


図 27

【図 28】

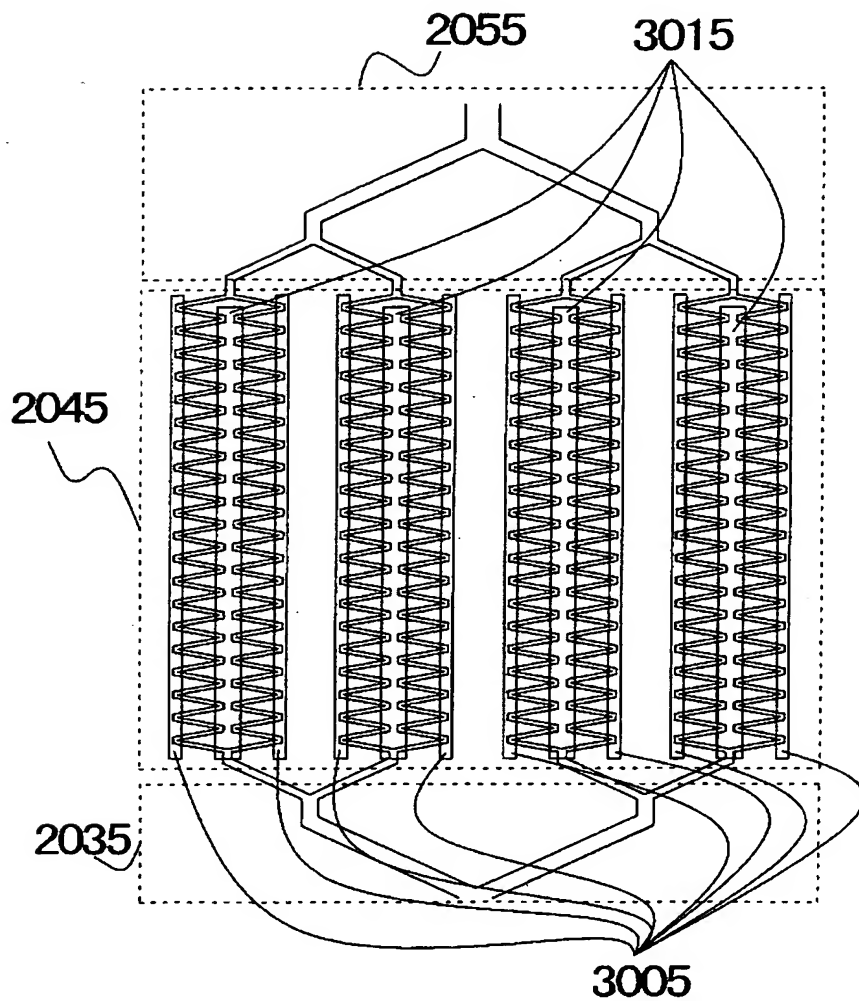


図 28

【図 29】

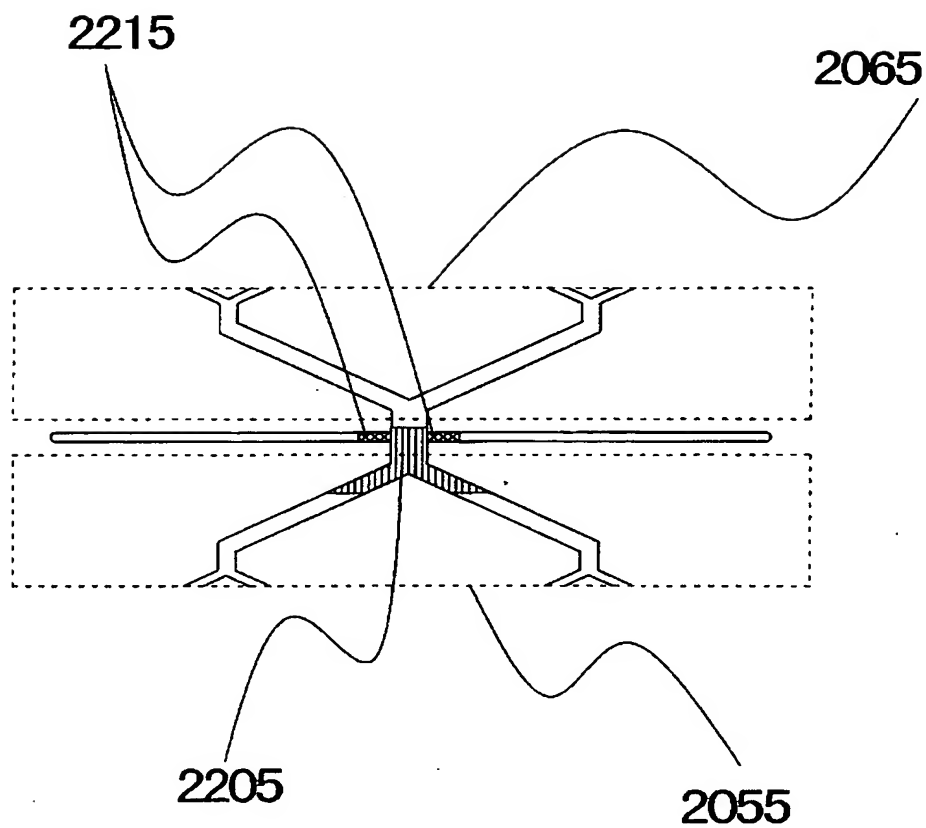


図 29

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 増幅効率の高い核酸増幅装置を提供する。

【解決手段】 核酸を含む試料と前記試料に混合する試薬とを含む反応流体の流れる流路と、前記流路が複数の分岐流路に分岐される流路分岐部、分岐した前記複数の分岐流路が合流する合流部、合流した前記反応流体が導かれる合流流路と、を備え、前記分岐流路に複数の設定温度域を備えた加熱機構を有する。

【選択図】 図 3

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 0 9 8 7 4 4
受付番号	5 0 3 0 0 5 4 6 1 7 7
書類名	特許願
担当官	関 浩次 7 4 7 5
作成日	平成 1 5 年 4 月 7 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成 15 年 4 月 2 日

次頁無

特願 2 0 0 3 - 0 9 8 7 4 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 5 1 0 8]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 3 1 日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区神田駿河台 4 丁目 6 番地
氏 名 株式会社日立製作所